

Université de Montréal

Rôle des ADN topoisomérases dans l'expression de gènes fimbriaires d'une  
souche septicémique d' *Escherichia coli*

Par

Julie Annick Desabrais

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maître  
En Microbiologie et Immunologie

Décembre 2003

© Julie Annick Desabrais, 2003



W

4

U58

2004

V. 087

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Rôle des ADN topoisomérases dans l'expression de gènes fimbriaires d'une  
souche septicémique d' *Escherichia coli*

Présenté par :  
Julie Annick Desabrais

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

George Szatmari, président rapporteur  
Marc Drolet, directeur de recherche  
Josée Harel, codirectrice de recherche  
Patrick Hallenback, membre du jury

## Sommaire

Pour infecter son hôte *Escherichia coli* 4787 (O115:K-:H51:F165) doit être en mesure de rapidement et correctement ajuster l'expression des gènes nécessaires à son infection. L'expression génique globale est régulée par l'action des ADN topoisomérases qui contrôlent la topologie de l'ADN. La synthèse d'adhésines, ici le fimbriae F165<sub>1</sub>, est également essentielle pour l'attachement et la colonisation de la souche *E. coli* 4787. Le fimbriae F165<sub>1</sub> est codé par l'opéron *foo* qui comprend 9 protéines permettant l'expression et l'assemblage et 2 protéines régulatrices (B et I). Ces deux dernières protéines sont positionnées de façon divergente et la région intergénique comprend des sites probables de liaisons à des régulateurs globaux tels Lrp, CRP et des séquences de méthylation par l'enzyme Dam.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes par lesquels les ADN topoisomérases contrôlent l'expression des adhésines fimbriaires (F165<sub>1</sub>) d'une souche septicémique de *E. coli*. Afin de vérifier l'influence du surenroulement global et local, nous avons utilisé des fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur *lacZ*. Nous avons remarqué que l'expression du gène *fooB* est réduite lorsque le niveau de surenroulement global est diminué (par la mutation *gyrB225* qui affecte la gyrase). De plus, lorsque le gène *topA*, qui code pour la topoisomérase I, l'enzyme responsable de la relaxation du surenroulement négatif, est délété l'expression de *fooB* est encore significativement diminuée. De plus, Fool un régulateur positif de l'expression de *fooB*, n'a pas d'effet sur l'expression de *fooB* dans une souche mutante *topA null*. Nous démontrons que la transcription divergente à partir d'un promoteur fort peut affecter grandement l'expression de *fooB* et compenser pour l'absence de Fool. Le fait que *fooI* et *fooB* soient transcrits de façon divergente semble avoir une influence sur le surenroulement local et sur l'expression de *fooB*. La topologie de l'ADN influencerait donc d'une façon significative l'expression de gènes *in vivo*; le surenroulement local pourrait être un facteur important de contrôle de l'expression de gènes.

**Mots clés :** *Escherichia coli* / fimbriae / ADN topoisomérases /  
surenroulement local / transcription divergente

## Summary

*Escherichia coli* 4787 (O115:K:H51:F165) is a pathogenic strain that causes septicaemia in pigs. To infect a host, bacteria should be able to rapidly and correctly modulate the expression of their genes. The global expression of the genes is regulated via DNA topoisomerases that control DNA topology.

The strain produces fimbriae F165<sub>1</sub> (P-like) encoded by the *foo* operon. The fimbriae is known to play a major role in the pathogenesis process by contributing to the attachment and colonisation. The *foo* operon encodes 9 proteins necessary for the assembly of the fimbriae and 2 regulatory proteins; FooB together with Fool are involved in the regulation of F165<sub>1</sub> synthesis. Interestingly, *fooI* and *fooB* are divergently transcribed and their intergenic region, containing putative binding sites for global regulators such as Lrp and CRP and sequences for methylation by Dam, is responsible for the regulation of *foo* operon expression.

The goal of our study was to verify if both global and local supercoiling (transcription-induced supercoiling within the intergenic region) can affect the regulation of *foo* expression. In order to study the influence of DNA supercoiling on *foo* operon expression, we constructed chromosomal *lacZ* fusions with the *fooB* gene and used a set of isogenic strains, allowing us to modulate both global and local supercoiling. We show that the expression of *fooB* is significantly perturbed when global negative supercoiling is reduced by a mutation, which decreases DNA gyrase activity. A deletion of the *topA* gene, encoding for topoisomerase I which can relax transcription-induced negative supercoiling, further reduced *fooB* expression. These results suggest that both global and transcription-induced supercoiling can significantly affect *fooB* expression. Moreover, Fool, a positive regulator of *fooB* expression, has no effect on *fooB* expression in the *topA* null mutant. We also show that divergent transcription from a strong promoter can significantly enhance *fooB* expression and compensate for the absence of Fool in a wild-type strain. The fact that *fooI* et *fooB* are divergently transcribed seem to influence on local supercoiling and on *fooB* expression. The DNA topology affect significantly genes expression *in vivo*, and local supercoiling could be a important factor of control of genes expression.

**Keys words:** *Escherichia coli* / fimbriae / DNA topoisomerases /  
local supercoiling / divergent transcription

## TABLES DES MATIÈRES

Page de titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Summary.....	iv
Tables des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi

## **SECTION I- INTRODUCTION**..... 1

REVUE DE LITTÉRATURE.....	2
1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	2
1.1.1 Historique et classification.....	2
1.1.2 <i>E. coli</i> pathogène.....	3
1.1.3 Pathologie.....	6
1.1.4 Interaction hôte-microorganisme.....	6
1.2 Les fimbriae.....	9
1.2.1 Les fimbriae P.....	11
1.2.2 Les fimbriae Pap.....	12
1.2.2.1 Généralités et structure.....	12
1.2.2.2 Opéron et régulation.....	14
1.2.3 Le fimbriae F165 <sub>1</sub> .....	17
1.2.3.1 Généralités et structure.....	17
1.2.3.2 Opéron et régulation.....	19
1.3 Les ADN topoisomérases.....	22
1.3.1 La topologie de l'ADN.....	22
1.3.2 Rôle et définition des ADN topoisomérases.....	28
1.3.3 La topologie de l'ADN et l'expression génique.....	33
1.3.4 La topologie de l'ADN et les gènes de virulence.....	42
PROBLÉMATIQUE.....	46

## **SECTION II- ARTICLE**.....48

DNA supercoiling and topoisomerases in F165 <sub>1</sub> fimbriae expression in the pathogenic <i>Escherichia coli</i> 4787 strain.....	49
Abstract.....	50
Introduction.....	52
Experimental Procedures.....	54
<i>Bacterial strains and plasmids</i> .....	54
<i>Media and growth conditions</i> .....	55
<i>DNA supercoiling analysis</i> .....	56
<i><math>\beta</math>-galactosidase assays</i> .....	56
<i>RNA extraction</i> .....	56
<i>Northern Blot</i> .....	56
<i>Primer Extension</i> .....	57
<i>Calculation of the switch frequency</i> .....	57
Results.....	59
<i>Effects of DNA supercoiling on <i>fooB</i> expression</i> .....	59
<i>Fool function is sensitive to supercoiling</i> .....	62
<i>Strong divergent transcription can fully compensate for the absence of Fool in a wild-type strain</i> .....	63
Discussion.....	66
Acknowledgements.....	69
References.....	70
Figure Legends.....	72

## **SECTION III- DISCUSSION**.....81

DISCUSSION.....	82
1. Effet du surenroulement d'ADN sur le promoteur <i>fooB</i> .....	82
2. Le rôle de Fool sur l'activité transcriptionnelle de <i>fooB</i> .....	88
3. La stimulation de l'activité de <i>fooB</i> par la transcription divergente en absence de <i>fooI</i> .....	89
4. Effet du surenroulement de l'ADN sur les motifs de méthylation aux sites GATC de la région régulatrice <i>foo</i> .....	93
CONCLUSION.....	96

## **BIBLIOGRAPHIE**.....97

## **ANNEXE**.....110



## LISTES DES TABLEAUX

### SECTION I

<b>Tableau 1.</b>	Description des types d'ADN topoisomérases d' <i>Escherichia coli</i> .....	29
-------------------	--	----

### SECTION II

<b>Table 1.</b>	Bacterial strains used in this study .....	74
-----------------	--	----

## LISTES DES FIGURES

### SECTION I

<b>Figure 1.</b>	Fimbriae à la surface d'une bactérie.....	9
<b>Figure 2.</b>	Modèle pour d'assemblage du fimbriae Pap de <i>E coli</i> .....	13
<b>Figure 3.</b>	Le mécanisme de la variation de phase chez l'opéron <i>pap</i> ....	14
<b>Figure 4.</b>	Organisation génique de l'opéron <i>foo</i> .....	20
<b>Figure 5.</b>	Expression du fimbriae F165 <sub>1</sub> en différentes conditions de croissance.....	21
<b>Figure 6.</b>	Différentes formes de molécules d'ADN.....	23
<b>Figure 7.</b>	Topologie de l'ADN.....	24
<b>Figure 8.</b>	Surenroulement négatif et positif.....	25
<b>Figure 9.</b>	Le « <i>twin domain model</i> » selon Liu et Wang.....	27
<b>Figure 10.</b>	Représentation de la réaction effectuée par la topo I.....	31
<b>Figure 11.</b>	Schéma d'un promoteur.....	35
<b>Figure 12.</b>	Variation de phase de l'opéron <i>fim</i> .....	44

### SECTION II

<b>Figure 1.</b>	Nucleotide sequence of a <i>Bam</i> H1- <i>Bgl</i> II DNA fragment carrying the <i>foo/B</i> intergenic region within pRS551.....	75
<b>Figure 2.</b>	DNA supercoiling in the bacterial strains used in this study.....	76
<b>Figure 3.</b>	A schematic drawing of the transcriptional fusions used in this study.....	77
<b>Figure 4.</b>	The effect of DNA supercoiling on <i>foo</i> expression. $\beta$ -galactosidase assays.....	78
<b>Figure 5.</b>	The effect of DNA supercoiling on <i>foo</i> expression. Northern blot analysis.....	79
<b>Figure 6.</b>	The effect of DNA supercoiling on <i>foo</i> expression. Primer extension analysis.....	80

### ANNEXE

<b>Figure 1.</b>	Modèle de régulation selon le surenroulement de la région intergénique de l'opéron <i>foo</i> .....	111
<b>Figure 2.</b>	Analyse des régulateurs globaux CRP et Lrp selon le surenroulement.....	112
<b>Figure 3.</b>	Figure de l'extension d'amorces de Fool.....	113
<b>Figure 4.</b>	Étude de la méthylation des sites GATC de la région intergénique <i>foo/B</i> .....	114

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

### Général

A	adénine
A-ADN	ADN de forme A
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénine diphosphate
AMP <sub>c</sub>	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARN <sub>m</sub>	acide ribonucléique messenger
ARN pol	ARN polymérase
ATP	adénine triphosphate
[ATP]/[ADP]	ratio de la concentration d'ATP par rapport à l'ADP
B-DNA	ADN de forme B
C	cytosine
CRPou CAP	<i>cAmp Receptor Protein</i> ou <i>Catabolite Activator Protein</i>
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
Dam	<i>Deoxyadenosine Methylase</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> EntéroAggrégatives
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragiques
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasives
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogènes
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogènes
ExPEC	<i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux
FIS	<i>Factor for inversion stimulation</i>
Foo	F165 <sub>1</sub> : <i>f one hundred sixty-five one</i>
Fot	F165 <sub>2</sub> : <i>f one hundred sixty-five two</i>
G	guanine
Gal $\alpha$ (1→4)Gal	$\alpha$ -D-galactosyl-(1-4)- $\beta$ -galactopyranose
GATC <sup>dist</sup>	GATC distal
GATC <sup>prox</sup>	GATC proximal
H-NS	<i>Histone like nucleoid structuring protein</i>
IHF	<i>Integration host factor</i>
IPTG	Isopropylthiogalactoside
Lac	phénotype Lactose
LB	<i>Luria-Bertani media</i>
Lk	<i>Linking number</i>
Lrp	<i>Leucine responsiveness protein</i>
LT	toxine thermolabile
MENEC	<i>E. coli</i> responsables de méningites
OD <sub>600</sub>	<i>optical density at 600 nm</i>
OFF	phase OFF: non expression du fimbriae
ON	phase ON: expression du fimbriae

Pap	<i>Pyelonephritis associated pili</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Prs	<i>pap-related sequence</i>
R-loop	boucle-R, hybrides ADN-ARN
RnaseH	ribonucléase H
Sec	système de sécrétion générale
SEPEC	<i>E. coli</i> septicémiques
ST	toxine thermostable
STEC	<i>E. coli</i> produisant des toxines de type <i>Shiga</i>
T	thymine
Tn10	transposon codant pour la résistance à la tétracycline
Topo I	topoisomérase I
Topo II	Topoisomérase II ou gyrase
Tw	<i>twist</i>
U	uracil
UAS	<i>Upstream Activator Sequences</i>
UPEC	<i>E. coli</i> responsables d'infections urinaires
UTI	<i>urinary tract infection</i>
Wr	<i>writhe</i>
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
Z-DNA	ADN de forme Z

Unités de mesureSymboles

<i>bp</i>	<i>base pair</i>	$\alpha$	alpha
$^{\circ}\text{C}$	degrés Celsius	$\beta$	bêta
g	gramme	$\Delta$	différence ou délétion bactérienne
Kb	kilobase	$\sigma$	facteur sigma de l'ARN polymérase
L	litre	$\lambda$	bactériophage lambda
KDa	kiloDalton	$\tau$	nombre de supertours d'une molécule d'ADN
m	mètre	+	phénotype exprimé ( $\text{Xyz}^+$ ) ou allèle sauvage ( $\text{xyz}^+$ )
mg	milligramme ( $10^{-3}$ g )	-	phénotype non-exprimé ( $\text{Xyz}^-$ ) ou allèle mutant ( $\text{xyz}^-$ )
mL	millilitre ( $10^{-3}$ L )	$\pm$	plus ou moins
mm	millimètre ( $10^{-3}$ m )	$\downarrow$	site de clivage
mg/mL	mg par mL		
mM	millimolaire ( $10^{-3}$ molaire )		
nm	nanomètre ( $10^{-9}$ m)		
pb	paire de base		
$\mu\text{g}$	microgramme ( $10^{-6}$ g)		
$\mu\text{L}$	microlitre ( $10^{-6}$ L)		
$\mu\text{m}$	micromètre ( $10^{-6}$ m)		
$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g}$ par mL		

## Remerciements

Je tiens à souligner l'appui des personnes suivantes tout au long de ma maîtrise :

À Marc Drolet, mon directeur de recherche, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, transmit une partie de ses connaissances et m'avoir permis de réaliser pleins de choses inattendues.

À Josée Harel, codirectrice de recherche, pour ses idées, son savoir et sa patience.

Aux membres du laboratoire : Chadi Hraiky, Patrick Sanscartier, Sonia Broccoli, Charles Fortin, Fabien Rallu et Imad Baaklini qui m'ont tous aidée et m'ont aussi fait bien rire quelquefois...

À nos voisins des laboratoires de Belhumeur et Szatmari en particulier Philippe pour avoir si souvent marché à mes côtés...

À mes parents, Paul et Joane, et mon petit-frère-plus-grand-que-moi, Jean-Philippe pour leur soutien (je ne parle pas juste ici du moral...) et leurs encouragements...

À Alexandre, pour m'avoir accompagné dans ce petit bout sur l'autoroute de la vie qui a parfois été cahoteux...

À mes ami(e)s qui ont su si bien me divertir, m'écouter et parler au téléphone.

Comme dirait la chanson : c'est un M avec un E et un R, ajouter un C et un I qu'est-ce que ça fait ? Merci, merci, merci !!!!

Tout simplement MERCI !!!

## SECTION I- Introduction

## Revue de littérature

### 1.1 *Escherichia coli*

#### 1.1.1. Historique et classification

La bactérie *Escherichia coli* qu'on retrouve sur la plupart des aliments non cuits, dans l'environnement inanimé et dans la flore normale de l'intestin des mammifères, fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette famille comprend des bactéries bâtonnets Gram négatif, non sporulantes et aérobie facultatives. *E. coli* est considéré comme un organisme modèle, c'est l'un des organismes les plus étudié et il est facile de travailler avec ce microorganisme. Il existe des milliers de souches de *E. coli*; en 1944 Kauffman a proposé un système de classification sérologique et a basé son modèle de sérotypes sur trois types d'antigènes : l'antigène somatique (O), l'antigène de la capsule (K) et l'antigène du ou des flagelles (H). Il avait décrit initialement 25 O, 55 K et 20 H.

L'antigène O est composé de complexes lipopolysaccharidiques qui font partis de la membrane cellulaire des bactéries. L'antigène de la capsule K est composé essentiellement d'acides polysaccharidiques. Il est intéressant de noter qu'*E. coli* K12 n'a rien à voir avec l'antigène K12, c'est seulement une coïncidence de nomenclature. Certains fimbriae (l'antigène F) ont été nommés selon leurs antigènes K par exemple, K88 (ou F4) et K99 (ou F5) et sont associés respectivement avec les souches d'*E. coli* responsables de diarrhées chez les cochons et les veaux. L'antigène des flagelles H est basé sur les différents types de flagelline présente dans la structure du flagelle. Initialement, les souches d'*E. coli* étaient désignées par les trois types d'antigènes O, K et H, de nos jours l'antigène K est moins utilisé.

Ainsi la souche *E. coli* 4787 est caractérisée comme suit : O115 : K- : H51 : F165 (Harel *et al.*, 1992b) et *E. coli* 5131 est O115 : K "V165" : F165 (Ngeleka *et al.*, 1992). Les souches positives pour F165 appartiennent souvent aux sérogroupes suivant : O4, O7, O8, O9, O11, O13, O15, O17, O18, O20, O23, O24, O25, O78, O86, O101, O115, O117, O139, O141, O149 et O153 (Contrepolis *et al.*, 1989; Maiti *et al.*, 1993).

### 1.1.2. *E. coli* pathogène

*Escherichia coli* est une bactérie capable d'occuper des niches écologiques variées. C'est en particulier une bactérie commensale du tube digestif des mammifères, qui peut devenir parfois pathogène chez un hôte dont les défenses immunitaires sont amoindries. Par contre, certaines autres souches d'*E. coli* synthétisant des facteurs de virulence sont toujours pathogènes. Cette bactérie est susceptible d'occasionner une grande diversité de pathologies, qu'elles soient intestinales (entérites, diarrhées) ou extra-intestinales (infections urinaires, septicémies, méningites, mammites). Des critères étiopathogéniques sont actuellement à l'origine d'une classification des *E. coli* pathogènes en plusieurs familles qui se distinguent par les facteurs de virulence, les syndromes cliniques, les caractéristiques épidémiologiques et l'appartenance à divers sérotypes O, K et H. Une souche est classée dans une catégorie selon ses caractéristiques de virulence médiées par les toxines, les facteurs d'adhérence, les systèmes d'acquisition du fer, les hémolysines biotypes et les résistances aux antibiotiques (Low *et al.*, 1994 et site internet : <http://ecoli.bham.ac.uk/>).

Dans le cas des infections entériques, *E. coli* est à l'origine de diarrhées aiguës qui peuvent prendre des formes diverses selon l'expression des facteurs de virulence caractérisant le *E. coli* pathogène qui prolifère



massivement au contact de l'épithélium intestinal (production d'entérotoxines cytotoniques ou cytotoxiques, entéroinvasion, entéroadhésion, etc.). Il existe au moins six classes : ETEC (*E. coli* entérotoxigènes), EPEC (*E. coli* entéropathogènes), EIEC (*E. coli* entéroinvasives), DAEC (*E. coli* à adhésion diffuse), EAEC (*E. coli* EntéroAggrégatives) et STEC (*E. coli* produisant la Toxine de type *Shiga*) dont les souches humaines qui sont appelées EHEC (*E. coli* entérohémorragiques) (Levine, 1987; Nataro et Kaper, 1998; Donnenberg et Whittam, 2001).

*E. coli* entérotoxigènes (ETEC) est la cause majeure des diarrhées des jeunes animaux, des diarrhées déshydratantes des enfants dans les pays en voie de développement et des diarrhées du voyageur. Cette bactérie produit une et/ou deux entérotoxines : stable à la chaleur « *heat-stable toxin* » (ST) et non résistante à la chaleur « *heat-labile toxin* » (LT). La plupart des souches ETEC isolées des humains produisent des facteurs de colonisation fimbriaires spécifiques.

*E. coli* entéropathogènes (EPEC) est connu pour causer des diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement et cause des lésions au niveau de l'intestin de type attachant et effaçant.

*E. coli* entéroinvasives (EIEC) est similaire à *Shigella* spp. et est une cause importante de diarrhées dysentériques dans les pays tropicaux.

*E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) est une catégorie dont on dispose de peu d'information. Les maladies causées par les bactéries de cette catégorie ainsi que les modes de transmission ne sont pas très bien connus. Selon une seule étude, il semblerait que les symptômes rapportés soient plutôt des vomissements.

*E. coli* entéroAggrégatives (EAEC) est associé avec des diarrhées persistantes (plus de 14 jours) chez les enfants dans les pays en voie de développement et les souches faisant parties de cette catégorie ont comme propriété d'adhérer aux cellules HeLa grâce à des adhésines particulières.

La catégorie STEC comprend les *E. coli* pathogènes qui ont comme particularité la production de toxines de type *Shiga*. Cette classe comprend les souches humaines qui sont appelées *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Cette dernière catégorie est la cause de diarrhées hémorragiques et du syndrome d'urémie hémolytique. Ces bactéries produisent des facteurs d'adhérence et des antigènes somatiques qui comprennent le sérotype bien connu O157:H7.

Les ExPEC (*E. coli* pathogènes extra-intestinaux) forment le groupe responsable des infections extra-intestinales : il peut s'agir de colibacilles qui franchissent la paroi intestinale par translocation. Parmi les ExPEC, on retrouve des sous-groupes tels que les SEPEC (*E. coli* septicémiques) les MENEC (*E. coli* responsables de méningites), les UPEC (*E. coli* responsables d'infections urinaires), ainsi que les *E. coli* responsables de mammites bovines et porcines (Fairbrother *et al.*, 1986).

*E. coli* uropathogéniques (UPEC) est la cause la plus commune des infections urinaires, « *urinary tract infection* » (UTI). Ces souches possèdent des facteurs de virulence qui augmentent leur habilité à causer l'infection tels que les fimbriae P chez les humains (Hultgren *et al.*, 1996 et site internet : <http://ecoli.bham.ac.uk/1>). Les bactéries produisant les fimbriae Pap font parties de cette catégorie (Krabbe *et al.*, 2000). *E. coli* 4787 et 5131 font parties de la catégorie SEPEC et sont responsables de septicémies et de diarrhées chez les animaux (Fairbrother *et al.*, 1986; Harel *et al.*, 1992b).

### 1.1.3. Pathologie

Les *E. coli* pathogènes peuvent causer différentes pathologies mais elles se regroupent toutes habituellement sous quatre groupes : les infections du tractus urinaire (UTI), les septicémies, les méningites et les infections intestinales. Les pathologies causées par les bactéries à l'étude (*E. coli* 4787 et 5131) sont habituellement des diarrhées, suivi de fortes fièvres et de septicémies. Ces souches expriment l'antigène de surface F165 qui a été mis en évidence initialement en 1986 chez des souches porcines d'*E. coli* diarrhéiques non-entérotoxigènes et septicémiques (Fairbrother *et al.*, 1986). Au Canada, on retrouve les fimbriae F165 chez 14.3 % des échantillons provenant de porcelets morts. F165 est également trouvé chez 35% des veaux morts en état de septicémie au Canada, en France et en Inde (Contrepolis *et al.*, 1989). F165 a aussi été identifié chez des *E. coli* septicémiques humains, majoritairement de sérotypes O4 et O6 (Cherifi *et al.*, 1990).

### 1.1.4. Interaction hôte-microorganisme

Un microorganisme pathogène pour causer une infection doit pouvoir tout d'abord s'attacher à la muqueuse de l'hôte, s'y multiplier, résister aux mécanismes de défense de l'hôte et être en mesure d'endommager les tissus de l'hôte. L'attachement des bactéries aux cellules est une étape primordiale pour causer l'infection. Cet attachement, généralement irréversible, est nécessaire pour toute autre étape subséquente. Les bactéries pathogènes assemblent des structures qui sont des facteurs de virulence à leur surface qui servent d'organelles d'attachement. L'adhérence de ces structures d'attachement est déterminée par des protéines nommées adhésines. Les adhésines ont des structures

particulières qui leur permettent de reconnaître des molécules présentes chez les cellules de l'hôte, appelées récepteurs. Cette interaction, spécifique et forte, entre l'adhésine et le récepteur joue un rôle important dans la détermination de l'hôte et le tropisme des tissus (Hultgren *et al.*, 1996). Les fimbriae sont des adhésines en forme d'hélice semblable à des cheveux (« *hairlike fibers* »). Le fimbriae est composé de plusieurs protéines qui servent en fait de piédestal à la présentation de l'adhésine. Certaines protéines de fimbriae servent à la fois d'adhésine et de protéines de structure (par exemple, le fimbriae K88) (Low *et al.*, 1996). Certaines autres adhésines sont très courtes (moins de 2 nm) et ont tendance à s'enrouler en une masse adhésive à la surface de la bactérie, qui est parfois appelée antigène de capsule, pili d'agrégation ou curli. Il y a aussi beaucoup d'exemples d'adhésines qui ne font pas partie d'aucunes structures oligomériques connues; on les nomme adhésines non associées au fimbriae, « *non-pilus associated adhesines* » (Hultgren *et al.*, 1996).

Il y a à ce jour trois façons connues pour l'assemblage d'une adhésine : la voie chaperone/porine, la voie de sécrétion générale Sec et la voie extracellulaire de nucléation/précipitation. La première façon est commune à plusieurs souches de *E. coli* et la majorité des souches de *Salmonella*. Les curli, fimbriae composés de monomères CsgA, sont assemblés par la dernière façon (Hultgren *et al.*, 1996).

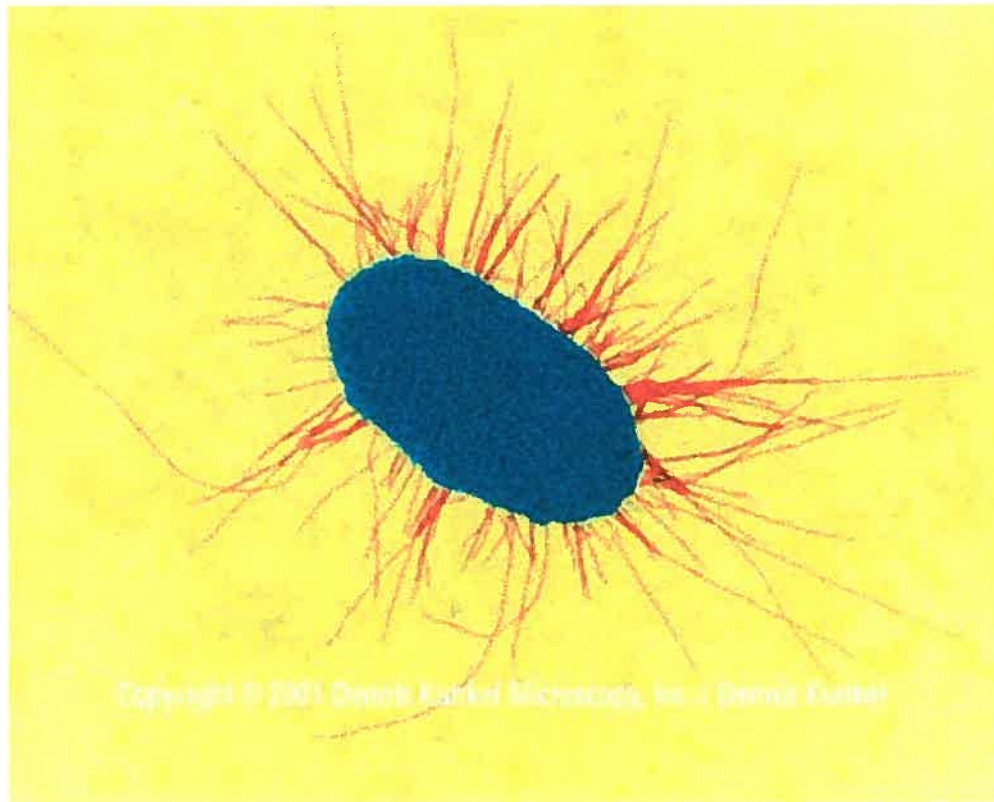
Donnenberg et Kaper ont proposé un modèle en 3 étapes pour l'infection d'un hôte. La première étape est l'adhérence médiée habituellement par des adhésines, la bactérie doit pouvoir se lier aux cellules épithéliales de l'hôte. La deuxième étape, le dialogue moléculaire, « *cross-talk* », entre l'organisme adhérent et les cellules épithéliales de l'hôte mène à un signal de transduction et un effacement du microvilli des cellules épithéliales. La troisième étape, si elle a lieu car toutes les souches pathogènes n'ont pas

un pouvoir d'invasion, l'invasine des bactéries se lie à la cellule épithéliale. Les bactéries doivent être capables d'interagir avec les cellules de l'hôte. Par exemple, les bactéries commensales ont travaillé leur relation d'anthropomorphisme avec l'hôte afin que la relation soit bénéfique ou neutre pour les deux organismes tandis que les bactéries pathogènes produisent des facteurs afin d'endommager l'hôte. Peu importe la façon de présenter l'adhésine, la reconnaissance des récepteurs de l'hôte est finement régulée pour permettre des interactions vraiment sélectives et temporelles avec l'hôte (Hultgren *et al.*, 1996).

## 1.2. Les fimbriae

Les fimbriae sont des structures caractéristiques de bactéries Gram-négatives comme *Escherichia coli* et *Salmonella*. C'est un des facteurs d'adhérence les plus étudiés. Ils sont généralement plus minces et plus nombreux par cellule (entre 100 et 1000 fimbriae par cellule) que les flagelles et ils ne sont pas, à une exception près, impliqués dans la mobilité cellulaire (Low *et al.*, 1996).

Les fimbriae sont des structures minces ressemblant à des cheveux, composés de plusieurs sous-unités ayant des poids moléculaires variant entre 14 et 30 kDa. Ils étaient historiquement distingués selon leur morphologie, leur sérologie, leur capacité d'agglutination des différents érythrocytes d'animaux, leur composition chimique et le type de récepteur reconnu. Maintenant, il existe plusieurs classifications des fimbriae, mais à l'heure actuelle aucune n'est unanimement utilisée.



**Figure 1.** Fimbriae à la surface d'une bactérie  
Adapté de : <http://www.denniskunkel.com/> Image number :71240A

Historiquement, les fimbriae ont été classifiés en utilisant leurs traits phénotypiques. Orskov et Orskov ont désignés 17 types F selon les propriétés phénotypiques des fimbriae (Orskov et Orskov, 1990).

La deuxième classification se base sur les catégories des structures des facteurs d'adhésion. Il existe deux catégories : le type 1 et 2. Le type 1 contient les fimbriae rigide de 7-10 nm de diamètre. Les sous-unités constitutives de ce type de fimbriae sont bien distinctes des sous-unités responsables de l'adhésion. Ce dernier type comprend entre autres les fimbriae Fim (aussi appelé le fimbriae de type I) P, S, Pap et F165. Le type 2 contient les fins filaments flexibles (fibrilles), de diamètre égal à 2 nm, ils recouvrent la surface bactérienne à la manière d'une capsule et seraient principalement constitués de l'adhésine (Low *et al.*, 1996).

Une troisième classification basée sur les propriétés adhésives divise en deux grands groupes les fimbriae. Les *E. coli* synthétisant des fimbriae font agglutiner les globules rouges de diverses espèces. Or, certains fimbriae lient des récepteurs contenant du mannose et l'hémagglutination est inhibée en présence de mannose dans le milieu environnant. Ces fimbriae, du premier groupe, sont alors dits sensibles au mannose (MS) (type I). Le second groupe, contient les fimbriae résistant au mannose (MR), car ils permettent l'agglutination des globules rouges même en présence de mannose (contient les fimbriae Pap et F165<sub>1</sub>). Toutefois, il existe des adhésines comme celle de 987P et de type 1C qui n'agglutinent pas les érythrocytes même si elles fixent les cellules eucaryotes (Hacker, 1992).

Les opérons codant pour les fimbriae contiennent tout ce qui est nécessaire à leur assemblage : les sous-unités majeures et mineures, les chaperones, les protéines d'assemblage et une ou deux protéines régulatrices. Les protéines du fimbriae originent initialement du cytoplasme et passe à travers la membrane cytoplasmique via un système

Sec-dépendant. L'expression des fimbriae n'est pas constitutive et dépend de facteurs environnementaux et plusieurs types de fimbriae peuvent être exprimés en même temps par une cellule. Les rôles de toutes les classes de fimbriae ne sont pas encore tout à fait compris, par contre, il a été clairement démontré que le fimbriae de type I (fimbriae Fim) est associé à l'adhésion cellulaire. Les fimbriae de type I sont composées d'une base rigide de 6 à 8 nm de diamètre et un bout plus court de 2 à 3 nm de diamètre (Low *et al.*, 1996).

Les souches d'*E. coli* 5131 et 4787 codent pour les fimbriae F165<sub>1</sub> et F165<sub>2</sub> qui font partie respectivement de la famille des fimbriae P et la famille des fimbriae S (Harel *et al.*, 1992b).

### 1.2.1 Les fimbriae P

La majorité des souches extra-intestinales d'*E. coli* associées avec les infections du tractus urinaires humains produisent des fimbriae P (Johnson, 1991). Les fimbriae P se lient à l'antigène P exprimé par les érythrocytes et d'autres tissus. Ces fimbriae permettent à la bactérie de s'attacher aux cellules de l'hôte pendant les premiers stades de l'infection. Les structures fimbriaires sont composées de trois principales parties : l'adhésine, la tige fibrillaire et la tige. La base du fimbriae, la tige, est ancrée dans la membrane externe de la bactérie. Les gènes codant pour cette structure, composée de six sous-unités différentes, sont tous regroupés dans un même opéron (Lee et Schneewind, 2001).

Les fimbriae P comprennent les fimbriae *prs* (*pap-related sequence*) et *pap* (*pyelonephritis associated pili*). Les fimbriae *prs* ont comme adhésine PrsG et se lient à la portion GalNAc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ GalNAc de l'antigène de Forssman (GbO5) sur les cellules sanguines. Les éléments de *prs* sont positionnés à la 94<sup>e</sup> minutes sur le chromosome de *E. coli* et font parti d'un îlot de pathogénicité, ces fimbriae causent en générale une cystite



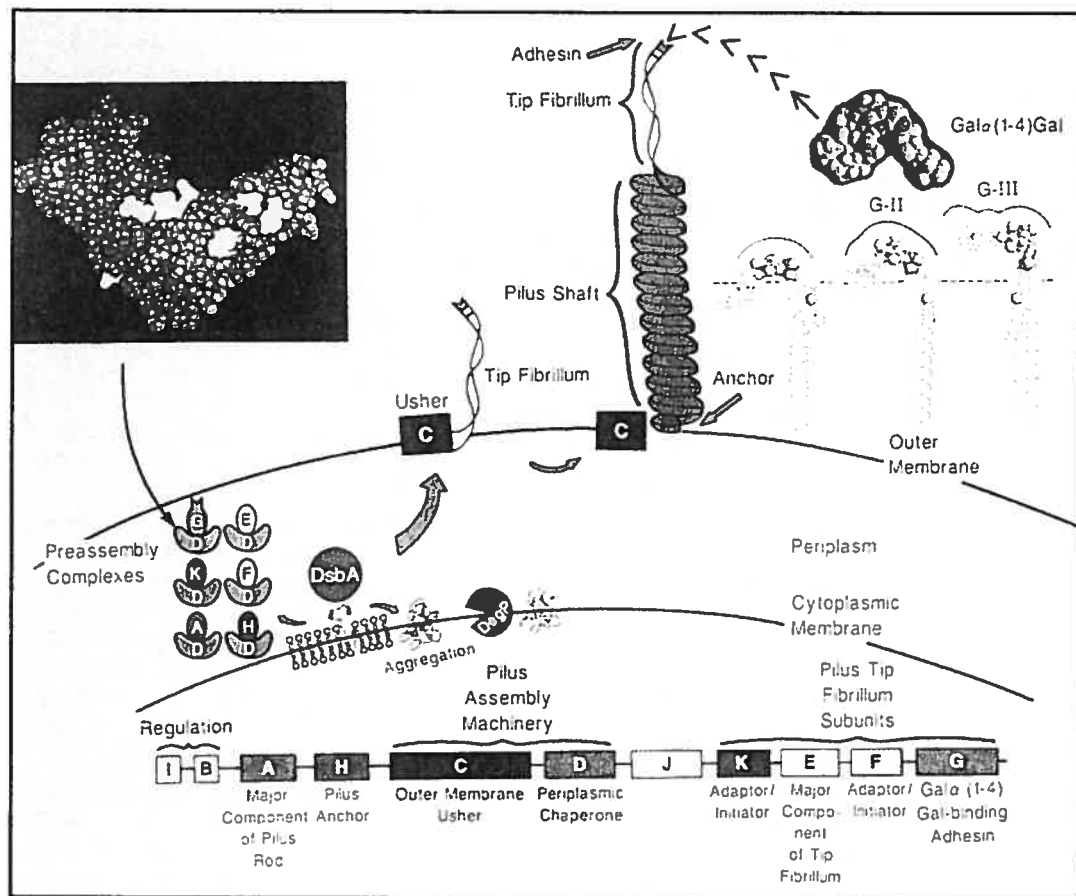
qui est une inflammation aiguë de la vessie. Les gènes du fimbriae Pap, situés à la 64<sup>e</sup> minutes comprennent les gènes de l'adhésine PapG qui reconnaît le récepteur Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ Gal présent sur les érythrocytes et les cellules épithéliales. Ces *E. coli* causent une cystite et une infection du tractus urinaire et peut parfois entraîner une inflammation du rein (Hultgren *et al.*, 1996).

## 1.2.2. Les fimbriae Pap

### 1.2.2.1. Généralités et structure

Les fimbriae Pap sont présents chez plusieurs souches d'*E. coli* UPEC, ils permettent l'attachement aux cellules uroépithéliales de l'hôte (Krabbe *et al.*, 2000). La structure de ce fimbriae est en forme d'hélice ouverte, avec une longue partie inférieure rigide et une courte partie supérieure flexible. L'adhésine qui se retrouve à l'extrémité supérieure du fimbriae se nomme PapG. Cette adhésine se lie à la portion Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ Gal des récepteurs glycolipidiques à la surface des cellules de l'hôte. PapG est lié à la sous-unité PapF, puis à la sous-unité qui compose la majeure partie du haut du fimbriae : PapE. La base rigide du fimbriae, de 1 à 2  $\mu$ m, est composée des sous-unités PapA (1200 à 2440 monomères assemblée en hélice vers la droite) et le fimbriae est terminé par l'ajout à sa base de la sous-unité PapH (Lee et Schneewind, 2001; Low *et al.*, 1996; Hultgren *et al.*, 1996). Pour permettre cet assemblage, les sous-unités doivent tout d'abord se retrouver dans l'espace périplasmique en utilisant le système de transport général Sec qui est un moyen de transport général. Dans cet espace périplasmique, les sous-unités PapA, PapH, PapK, PapE, PapF et PapG sont accompagnées d'un chaperon PapD, afin de prévenir un mauvais repliement des protéines de structure, et sont dirigées vers PapC (Hultgren *et al.*, 1996). Durant l'assemblage, les protéines s'associent

aussi avec PapC qui est en fait une porine dans la membrane externe d'environ 2-3 nm de diamètre (Lee et Schneewind, 2001). L'assemblage du fimbriae commence par l'extrémité supérieure et se termine avec la base contrairement à d'autres structures externes comme les flagelles qui sont assemblées de la base au bout (Low *et al.*, 1996).



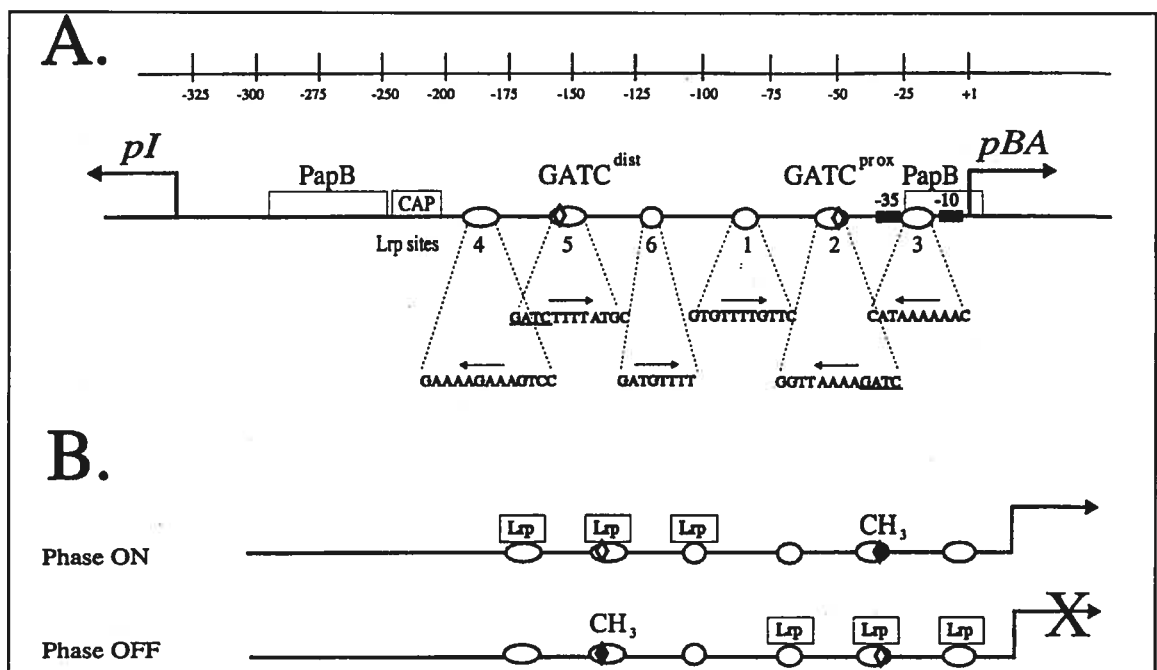
**Figure 2. Modèle pour d'assemblage du fimbriae Pap de *E. coli***  
Adapté de Hultgren, S.J., C. Hal Jones, and S. Normark. 1996. Bacterial adhesins and their assembly, p.2730-2756, *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and molecular biology, 2<sup>nd</sup> ed, vol. 2. ASM Press, Washington D.C.

Les analyses de structure/fonction des différents membres de fimbriae montrent que certains groupes d'opérons qui codent pour les protéines régulatrices partagent certaines similarités d'acides aminés. Par exemple, PapI et PapB partagent des acides aminés avec les protéines régulatrices des opérons suivants : *sfa*, *daa*, *afa*, *fae*, *pef* et aussi *foo* (Low *et al.*,

1996). Il y a une nuance à ajouter : ce n'est pas parce que les séquences des protéines régulatrices sont similaires que toutes les sous-unités majeures sont aussi similaires.

### 1.2.2.2. Opéron et régulation

L'opéron *pap* code pour neuf protéines qui sont toutes requises pour l'expression et l'assemblage du fimbriae Pap, et deux protéines régulatrices PapI et PapB. La transcription des promoteurs *pB* et *pI* est sensible aux signaux environnementaux comme la température et les sources de carbone. L'expression du fimbriae est sujette à la variation de phase, l'expression varie entre deux états : phases ON (fimbriae exprimé) et OFF (fimbriae réprimé).



**Figure 3.** Le mécanisme de la variation de phase chez l'opéron *pap*  
**(A)** La région régulatrice entre les promoteurs divergents *papB* et *papI*, est illustrée, les sites *GATC* méthylés par Dam, les sites de liaisons de Lrp, CAP et PapB.  
**(B)** Les patrons de méthylation et les sites de liaisons de Lrp sont représentés selon la variation de phase.

Adapté de Krabbe, M., N. Weyand, and D.A. Low. 2000. Environmental control of pilus gene expression, p. 305-321. Bacterial stress responses, vol. 1. ASM Press, Washington D.C.

L'opéron *pap* est régulé par la déoxyadénosine méthylase (Dam, 32 kDa) qui est nécessaire à la formation d'un patron de méthylation spécifique à deux séquences GATC localisées dans la région régulatrice entre *papI* et *papB*. En phase ON, le site GATC le plus près (GATC<sup>prox</sup>) du promoteur *papB* est méthylé et le GATC le plus distant (GATC<sup>dist</sup>) du promoteur *papB* (séparé par 102 pb de l'autre site GATC) est non méthylé. En phase OFF, le patron est inversé : GATC<sup>prox</sup> est non méthylé et GATC<sup>dist</sup> est méthylé (Bloomfield, 2001; Braaten *et al.*, 1994). Le patron de méthylation de la région intergénique de *pap* régule directement la transcription de l'opéron *pap*, en affectant la liaison des protéines avec l'ADN par un effet stérique direct ou un effet indirect (Low *et al.*, 2001). Par exemple, la méthylation inhibe la liaison de Lrp (Blyn *et al.*, 1990; Braaten *et al.*, 1994). Les niveaux de l'enzyme Dam sont critiques pour l'expression de *pap*; la surexpression et la sous-expression de Dam affecte la production des fimbriae Pap (Blyn *et al.*, 1990). En plus d'*E. coli*, des études ont démontré un rôle essentiel de la méthylation dans la virulence pour *Salmonella* (Heithoff *et al.*, 1999).

La formation du patron de méthylation par Dam dépend d'une interaction complexe entre les protéines de la régulation globale et les protéines codées par *pap*. Un joueur essentiel est Lrp, «*leucine responsiveness protein*» qui se lie coopérativement à deux groupes de sites dans la région intergénique désignés 1, 2, 3 (le site 3 chevauche GATC<sup>prox</sup>) et les sites 4, 5, 6 (le site 6 chevauche GATC<sup>dist</sup>). Tous ces six sites possèdent une séquence consensus GN<sub>2-3</sub>TTT (Nou *et al.*, 1995). Lrp est essentiel pour l'activation et la répression de *pap*. Pour l'activation de la transcription de *pap*, Lrp doit se lier aux sites 4, 5, 6 et il doit y avoir méthylation du site GATC<sup>prox</sup>. Inversement, la répression de la transcription nécessite la liaison de Lrp aux sites 1, 2, 3 et la méthylation de GATC<sup>dist</sup>. Lorsque Lrp se lie aux sites 1, 2, 3, il bloque la méthylation de GATC<sup>prox</sup> et la liaison de Lrp aux sites 4, 5, 6 bloque la méthylation de GATC<sup>dist</sup> (Nou *et al.*, 1993).

La liaison de Lrp est suffisante pour la formation des patrons de méthylation dans la région régulatrice *pap* (van der Woude *et al.*, 1998). Lrp, sous certaines conditions, forme des multimères (de 6 à 8) (Chen et Calvo, 2002), et peut lors de sa liaison courber l'ADN (Wang et Calvo, 1993), ce qui pourrait influencer la conformation de la région régulatrice de *pap*. Des études récentes indiquent qu'il doit y avoir un espacement approprié entre les sites de liaison de Lrp car l'insertion ou la délétion d'une seule base entre les sites 1 et 2 bloque la transcription dans la phase ON (Hernday *et al.*, 2002). Donc ces résultats suggèrent que l'hélicité pourrait avoir une influence importante sur la liaison de Lrp à la région intergénique du fimbriae Pap.

La production de PapI est également importante pour la transcription de l'opéron. PapI augmenterait l'affinité de Lrp pour les sites 4, 5, 6 et favoriserait la méthylation de GATC<sup>prox</sup> et la phase ON (Kaltenbach *et al.*, 1995). L'expression de *papI* est régulée par le régulateur global CRP, «cAMP Receptor Protein». Cette dernière enzyme se lie à l'AMPc et peut activer ou réprimer certains gènes, dans ce cas-ci, le complexe CRP-AMPc se lie en amont de *papI* pour l'activation de sa transcription. Donc l'expression de *papI* est sensible aux niveaux AMPc dans la cellule. Lorsque les bactéries poussent dans un milieu pauvre, il y a un haut niveau AMPc et par la suite, expression de *papI* (Blyn *et al.*, 1989 ; Goransson *et al.*, 1989). De plus, la liaison de CRP en amont du promoteur de *papB* serait essentielle pour l'activation de la transcription de ce promoteur même en l'absence du promoteur divergent *papI*. L'activation par CRP est dépendante de l'hélicité de l'ADN (Weyand *et al.*, 2001).

La protéine PapB, via trois sites de liaison dans la région intergénique, activerait indirectement la transcription de l'opéron *pap* en induisant la transcription de *papI* via son promoteur (Xia *et al.*, 1998) et agirait aussi comme régulateur de sa propre transcription (Xia *et al.*, 1999). PapB se lierait au sillon mineur de l'ADN de la région intergénique sous forme de

multimère. Cette protéine aurait aussi un rôle important à jouer dans le dialogue (« *cross-talk* ») entre différents opérons codant pour des fimbriae afin d'empêcher l'expression du fimbriae de type 1 (Fim) dans la même cellule (Xia *et al.*, 2000).

De plus, H-NS agit dans ce système comme un répresseur en se liant spécifiquement à la région régulatrice de *pap* et bloquerait ainsi la méthylation des sites GATC à basses températures (sous 26°C). Par contre, il a été démontré que H-NS n'est pas essentiel à la variation de phase (White-Ziegler *et al.*, 1998).

Comme nous venons de le mentionner, l'expression du fimbriae Pap est régulé par les conditions environnementales (Blyn *et al.*, 1989), tel que la source de carbone (via CRP), les acides aminés (via Lrp), le fer, la température (possiblement via H-NS). En général, les fimbriae sont activés par des milieux de croissance pauvres et réprimés par des températures sous 26°C mais ne sont pas réprimés par l'ajout de leucine et/ou alanine au milieu (Krabbe *et al.*, 2000). De plus au niveau génétique, lorsque des mutants  $Lrp^-$ ,  $Crp^-$ ,  $Dam^-$ ,  $PapI^-$  ou  $PapB^-$  sont utilisés, il n'y a pas expression du fimbriae Pap (Hernday *et al.*, 2002).

### **1.2.3. Le fimbriae F165<sub>1</sub>**

#### **1.2.3.1. Généralités et structure**

Le complexe fimbriae F165 est produit par les souches impliquées dans la septicémie chez les porcs, les veaux (Fairbrother *et al.*, 1986; Harel *et al.*, 1991) et les humains. Il a été caractérisé pour la première fois en 1986 par l'équipe de Fairbrother (Fairbrother *et al.*, 1986). F165 est retrouvé dans des souches de *E. coli* isolées de veaux et de cochons avec septicémie et/ou diarrhée. Le complexe fimbriaire a un diamètre de 5 à 8

nm. Par la suite, ils ont été en mesure de caractériser au moins deux fimbriae exprimés par la souche d'*Escherichia coli* 4787 qui sont sérologiquement et génétiquement distincts, F165<sub>1</sub> et F165<sub>2</sub> (Fairbrother *et al.*, 1988; Harel *et al.*, 1992a).

Le fimbriae F165<sub>1</sub> encodé par l'opéron *foo* (8 gènes) (voir les numéros d'accèsion : *f165<sub>1</sub>* L07420 et *foo* AF109675) et *fooA* est responsable de la sous-unité fimbriale majeure (18,5kDa) de la souche 4787; F165<sub>2</sub> est encodé par le gène *fotA* responsable de la sous-unité fimbriale mineure (17 kDa) de cette même souche. La caractérisation des régions régulatrices des opérons des fimbriae F165<sub>1</sub> et F165<sub>2</sub> démontre une organisation similaire des régions de régulation des opérons des fimbriae P et S (Harel *et al.*, 1992b). F165<sub>1</sub> est associé au fimbriae F11, un membre de la famille des fimbriae P, et porte l'adhésine G de classe III similaire aux fimbriae *prs* avec des capacités d'attachement légèrement différentes. Des tests d'adhésion *in vitro* ont démontré que F165<sub>1</sub> permet aux *E. coli* produisant l'adhésine G d'adhérer aux cellules MDCK-II, des cellules épithéliales rénales canines (Harel *et al.*, 1992b). L'opéron *foo* est un opéron mosaïque qui contient de séquences reliées à *pap* et à *prs* (Maiti *et al.*, 1994). Le fimbriae F165<sub>2</sub>, est étroitement reliés au fimbriae F1C (Harel *et al.*, 1995) mais son rôle dans le développement de la colisepticémie porcine n'est pas encore bien connu.

Le rôle exact du complexe F165<sub>1</sub> n'est pas encore tout à fait connu. Des tests d'infections expérimentales avec la souche sauvage et des mutants F165<sub>1</sub><sup>-</sup> ont démontré que les fimbriae F165<sub>1</sub> permettrait la résistance à la phagocytose et la colonisation intestinale des bactéries (Ngeleka *et al.*, 1992 et 1993). De plus, des expériences compétitives avec des porcs ont permis d'évaluer le rôle du fimbriae dans la virulence de la souche d'*Escherichia coli* 5131. Ngeleka *et al.* ont utilisé les souches 5131 qui exprimaient les fimbriae F165<sub>1</sub> *in vivo* et la souche M48 qui n'exprimait pas les fimbriae. Après infection, ils retrouvaient dans le sang la souche

5131. F165<sub>1</sub> a donc un rôle important dans l'infection et la survie intestinale des bactéries (Ngeleka *et al.*, 1993).

La souche 5131 possède plusieurs caractéristiques généralement associées aux souches uropathogènes humaines telles que la résistance au mannose lors de l'héماغلutation, la résistance au sérum, l'aérobactine et ColV (Harel *et al.*, 1993). Cependant, à la différence des souches uropathogènes humaines, cette souche est non hémolytique et appartient au sérogroupe O115 qui est habituellement associé aux souches porcines *E coli* F165 positives (Fairbrother *et al.*, 1986).

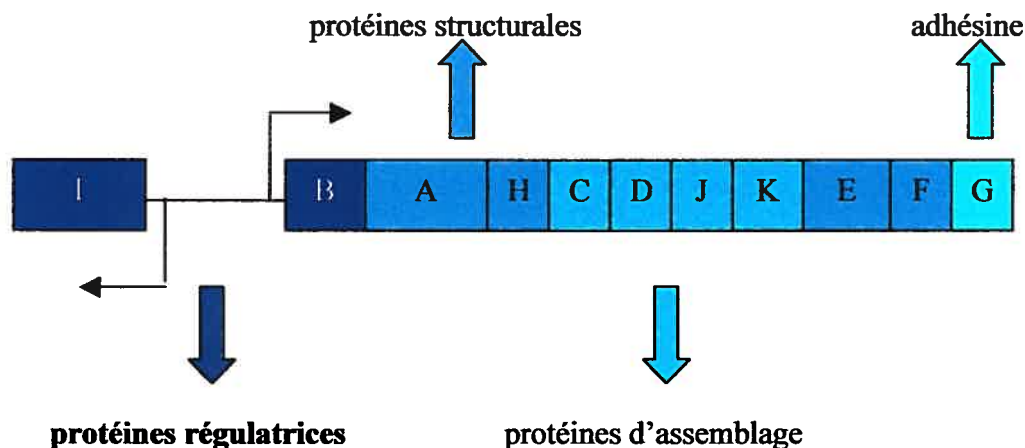
Selon une étude de Contrepolis *et al.* en 1989 qui étudiait la prévalence du fimbriae F165 d'*E. coli* chez des isolats de porcs et de bœufs, 17.7% des échantillons de bœuf possédaient le fimbriae seul et 17.3% l'exprimait conjointement avec un autre fimbriae, CS31A. Au Canada, on retrouvait F165 chez 14.3% des porcs morts (Contrepolis *et al.*, 1989). De même, une autre étude en 1995 caractérisait les souches d'*E. coli* qui produisent le fimbriae F165. L'antigène de surface de F165 était retrouvé chez 5,63% des souches d'*Escherichia coli* provenant de porcelets vivants. Les souches d'*E. coli* possédant le fimbriae étaient retrouvées dans différentes parties de l'intestin des porcs à l'étude : 11% des souches d'*E. coli* retrouvés dans l'iléum possédait l'antigène de surface F165, 16% dans le caecum et 7,4% dans le côlon (Ganaba *et al.*, 1995).

#### 1.2.3.2. Opéron et régulation

L'opéron codant pour le fimbriae F165<sub>1</sub> comprend, comme l'opéron *pap*, 2 protéines régulatrices, 8 protéines d'assemblage et de structure et une adhésine (Daigle *et al.*, 1997). La région intercistronique de *FoolB* de la souche d'*Escherichia coli* 5131 est identique à celle de la souche 4787 et



possède 97% d'identité avec la région régulatrice de *pap*, du fimbriae P sérotype F13 de la souche J96 (Daigle *et al.*, 2000). Dans cette région on retrouve des séquences de liaisons homologues à *papB* (Forsman *et al.*, 1989) et Lrp (Nou *et al.*, 1995).

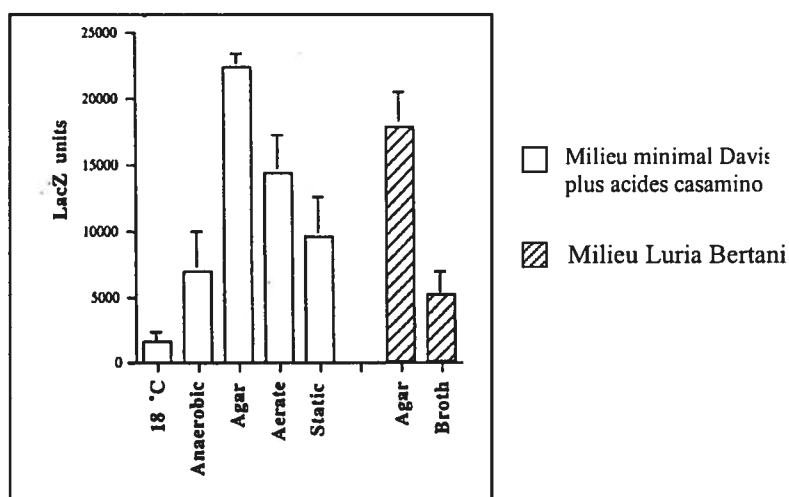


**Figure 4.** Organisation génétique de l'opéron *foo*.

Adapté de Daigle, F., C.M.Dozois, M.Jacques, and J.Harel. 1997. Mutations in the f165(1)A and f165(1)E fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicaemia in pigs. *Microb Pathog* 22: 247-252.

L'expression de ce fimbriae est influencée par les conditions environnementales telles que la disponibilité des nutriments, l'osmolarité et la température. En réalisant des fusions de la région *foo/B* avec le gène rapporteur *lacZ*, Daigle *et al.* ont pu mesurer la production de  $\beta$ -galactosidase et par conséquent, l'expression de *FoolB* en différentes conditions de croissance. Pour obtenir une expression maximale du fimbriae, la bactérie doit être sur milieu minimal solide à 37°C, à un pH neutre (voir figure suivante). L'expression de l'opéron *foo* est réprimée par le glucose, la leucine, l'alanine et les basses températures (Daigle *et al.*, 1997; Fairbrother *et al.*, 1988). Des régulateurs globaux tels que les

récepteurs protéiques de l'AMPc (CRP) et la protéine régulatrice de la leucine (Lrp) ont aussi une influence dans la régulation de l'expression du fimbriae F165<sub>1</sub> (Daigle *et al.*, 2000). Lorsque l'AMPc est ajouté au milieu de croissance, une augmentation de l'expression de *foo* fusionné au gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase était observée. De plus, dans des bactéries (*lrp*<sup>-</sup>) n'exprimant pas le régulateur global Lrp, lorsque les fusions *foo-lacZ* étaient réalisées, les résultats de  $\beta$ -galactosidase ne démontraient qu'une expression minime des gènes fimbriaires *foo/B*. L'analyse de la région nucléotidique intergénique *foo/B*, indique la présence de 2 sites GATC conservées, qui sont reconnus par la méthylase déoxyadénosine (Dam), ainsi que des sites de liaisons de CRP et de Lrp (Daigle *et al.*, 2000).



**Figure 5.** Expression du fimbriae F165<sub>1</sub> en différentes conditions de croissance. Dosage de  $\beta$ -galactosidase du gène *fooB* en différentes conditions de croissance et milieu.

Adapté de Daigle, F., C.Forget, C.Martin, M.Drolet, M.C.Tessier, H.Dezfulian, and J.Harel. 2000. Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Res Microbiol* 151: 563-574.

La production de F165<sub>1</sub> dépend aussi de la variation de phase. La variation de phase est réversible et est contrôlée au niveau de la transcription. En présence de leucine ou alanine, il n'y a pas de variation

de phase et la leucine réprime aussi l'expression basale de l'opéron *foo*. Le changement ON à OFF et OFF à ON ne se fait plus et la cellule bloque à un stade intermédiaire qui est plus haut que la phase OFF mais plus bas que la phase ON (Harel *et al.*, 2000) contrairement à ce qui est observé pour *pap* (Krabbe *et al.*, 2000).

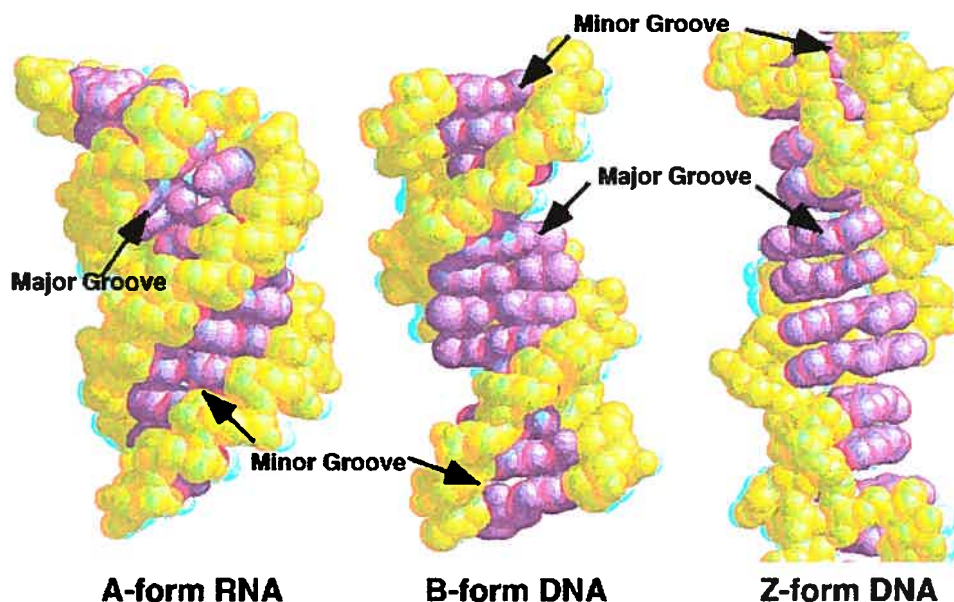
Le contrôle de la régulation globale de l'expression des gènes des fimbriae implique également la topologie de l'ADN. En utilisant encore une fois le gène rapporteur *lacZ*, Daigle *et al.* (2000) constatent une diminution de l'expression du gène fimbriaire d'environ deux fois dans une souche  $\Delta topA$  *gyrB*(Ts) (4000 U) comparé à l'expression dans une souche isogénique du type sauvage (9438 U). Aussi, il y a une légère diminution d'expression lorsque seul *gyrB* est muté (7760 U) comparé à la souche sauvage. Les mutations  $\Delta topA$  *gyrB*(Ts) affectent deux enzymes responsables du contrôle du surenroulement de l'ADN : soit la gyrase et la topoisomérase I. Il y aurait donc un effet important de la topologie dans l'expression du gène fimbriaire *foo* (Daigle *et al.*, 2000).

### 1.3. Les ADN topoisomérases

#### 1.3.1. La topologie de l'ADN

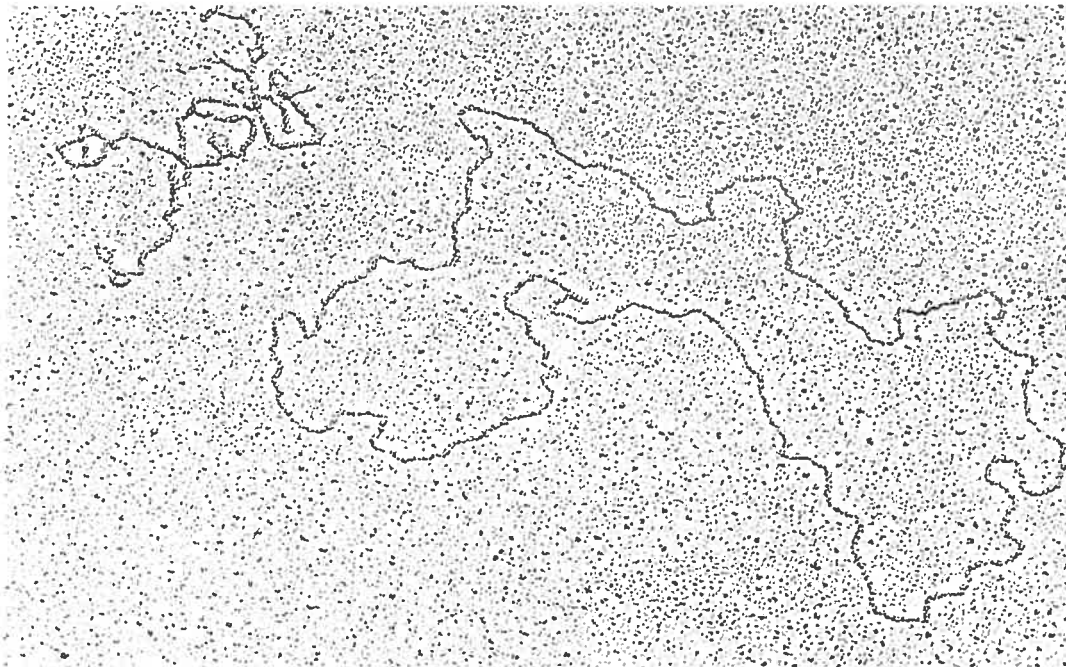
On sait depuis Watson et Crick en 1953 que l'ADN est dans la cellule sous forme d'une double hélice, antiparallèle et complémentaire. Depuis ce temps, le modèle a beaucoup évolué. Il existe trois structures secondaires de l'ADN : l'ADN de forme B *de pas de droit*, l'ADN de forme A *de pas de droit* et l'ADN de forme Z *de pas de gauche*. L'ADN de forme B (*B-DNA*), la forme qu'on retrouve majoritairement *in vivo* est compacté vers la droite et contient 10.5 paires de bases par tour d'hélice. On retrouve 2 sillons, un sillon majeur et un sillon mineur, qui forment des surfaces distinctes avec lesquelles les protéines peuvent interagir. L'ADN

de forme Z (*Z-DNA*) contient 12 paires de bases par tour d'hélice et a une forme de zig-zag qui tourne vers la gauche. Cette forme peut apparaître surtout lorsqu'il y a des séquences alternées de purines et de pyrimidines, lorsque certaines séquences d'ADN sont méthylées, lorsque certaines protéines se lient à l'ADN et lorsque l'ADN est surenroulé négativement. L'importance biologique de l'ADN de forme Z demeure encore inconnue à ce jour. Certaines hypothèses sont avancées quant à ses possibles rôles: contrôler le niveau de surenroulement, fournir un «*switch*» moléculaire pour l'expression génique et une action directe sur la transcription (Sinden, 1994). Il existe également l'ADN de forme A (*A-DNA*), moins répandu et que l'on retrouve plutôt lorsque l'ADN est déshydraté ou encore chez l'ARN (Rahmouni et Wells, 1992).



**Figure 6.** Différentes formes de molécules d'ADN  
Adapté de :  
<http://www.tulane.edu/~biochem/nolan/lectures/rna/images/abz.GIF>

La taille du chromosome complet d'*Escherichia coli* est environ mille fois plus importante que celle de la cellule elle-même : en effet, la taille moyenne du chromosome de *E. coli* est de 1 mm et celle de la cellule est de 1  $\mu\text{m}$  . L'ADN doit donc être surenroulé sur lui-même afin de pouvoir être contenu dans la cellule (Pettijohn, 1996).

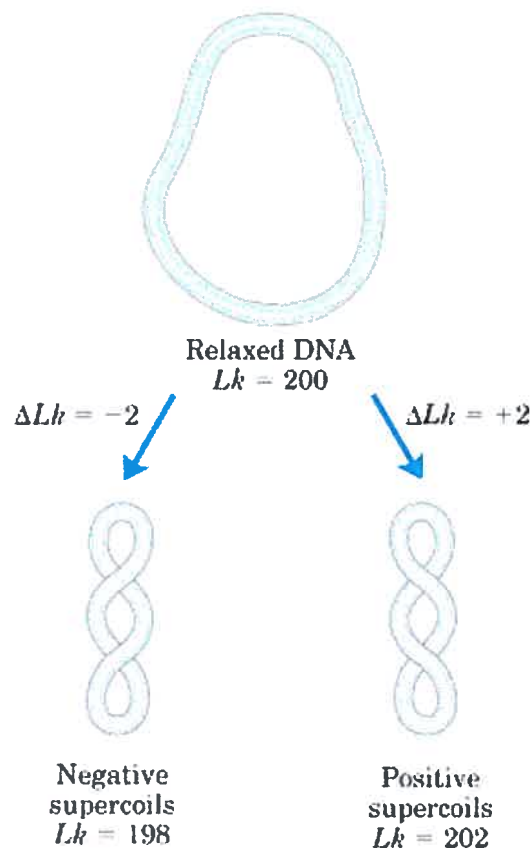


**Figure 7.** Topologie de l'ADN. Molécule d'ADN surenroulée (à droite) et relaxée (à gauche) tel observé par microscopie électronique. La taille de cette molécule est de 9000 paires de bases.

Adapté de : Sinden R.R. 1994. DNA structure and function. Academic Press, Inc., San Diego, California.

Il existe deux types de surenroulement : le surenroulement positif et le surenroulement négatif. Par convention, l'ADN est dit surenroulé positivement lorsqu'il est enroulé dans le même sens que l'hélicité et par conséquent, les brins ont tendance à se fermer. Le surenroulement positif a des rôles connus surtout chez les organismes thermophiles pour contrer

l'effet de la haute température sur la séparation des brins d'ADN (Forterre *et al.*, 1996). L'ADN est surenroulé négativement lorsque la molécule est enroulée dans le sens inverse par rapport à l'hélicité. C'est ce dernier type de surenroulement que l'on retrouve dans la majorité des cellules et qui permet l'ouverture des brins d'ADN.



**Figure 8.** Surenroulement négatif et positif  
Adapté du site internet : <http://www.tiem.utk.edu>

Nous verrons un peu plus loin que lorsque le surenroulement négatif est assez élevé localement, il y a formation d'une région d'ADN simple brin, ce qui facilite des activités telles que la réplication et la transcription (Liu et Wang, 1987).

Le surenroulement d'une molécule d'ADN peut être défini de façon mathématique par la relation suivante :  $Wr = Lk - Tw$ , où  $Wr$  (*writhe*) est la contorsion géométrique de l'axe de l'hélice,  $Lk$  (*linking number*) est le nombre de fois qu'un brin de la double hélice croise l'autre et  $Tw$  (*twist*), qu'on nomme également torsion, est le nombre de tours de la molécule dans sa forme relaxée. Il y a surenroulement ( $Wr$ ) positif ou négatif lorsque  $Lk \neq Tw$ .

Le surenroulement peut également être décrit à l'aide de la relation qui suit :  $\tau = Lk - Lk_0$ .

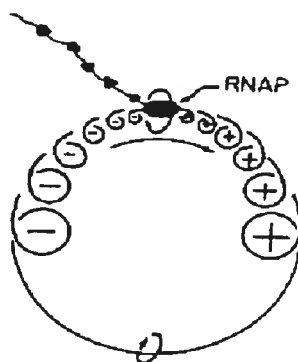
Où  $\tau$  est le nombre de supertours,  $Lk$  est le nombre de topoisomères surenroulés et  $Lk_0$  est le nombre de topoisomères d'une molécule d'ADN relaxée.

Une molécule d'ADN surenroulée a plus d'énergie qu'une molécule d'ADN relaxée. Le surenroulement est perdu spontanément lorsque survient une coupure dans l'ADN.

Prenons le cas d'une molécule d'ADN surenroulé, les supertours négatifs vont diminuer s'il y a un passage intramoléculaire d'un brin ce qui augmente le  $Lk$  (*linking number*). Toutes les topoisomérases sont capables de cette activité *in vitro* qui se nomme relaxation. Par contre, seulement la gyrase est capable *in vitro* d'augmenter les supertours négatifs et donc de diminuer le  $Lk$  (*linking number*) (Drlica, 1984).

En 1987, Liu et Wang ont proposé le « *twin domain model* » pour expliquer le surenroulement généré lors de la transcription de l'ADN. L'ARN polymérase qui avance sur la matrice d'ADN génère du surenroulement positif en avant et du surenroulement négatif à l'arrière (Liu et Wang, 1987). Le complexe de transcription qui comprend l'ARN polymérase, le nouvel ARN naissant et les protéines qui se lient à l'ARN, forment une structure de masse importante. Cette structure n'est pas en mesure de tourner autour de l'ADN par conséquent, c'est la double hélice

d'ADN qui doit tourner sur elle-même. La topoisomérase I enlève les supertours négatifs, alors que la gyrase élimine les supertours positifs. Afin que la cellule puisse effectuer ses fonctions essentielles, il doit y avoir une fine régulation du surenroulement. Les ADN topoisomérases doivent contrôler précisément le niveau optimal de surenroulement. Par exemple, un excès de supertours négatifs qui peut être créés par l'absence de topoisomérase I est létale pour la cellule (DiNardo *et al.*, 1982). En effet, le gène de la topo I est un gène essentiel et lorsque ce gène est délété le niveau de surenroulement de l'ADN devient trop « excessif » pour que la cellule soit en mesure d'effectuer ses fonctions. Cependant, on remarque la survie des cellules lorsqu'il y a des mutations compensatoires dans les gènes codant pour la gyrase dans les souches où le gène de topo I est délété (Pruss *et al.*, 1982). Il y a donc un équilibre entre les actions de la topoisomérase I et de la gyrase pour le maintien de niveaux de surenroulement optimal pour une croissance normale des bactéries.



**Figure 9.** Le « *twin domain model* » selon Liu et Wang  
Adapté de : Liu L.F. and J.C. Wang. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 :7024-7027.

Les niveaux de surenroulement sont aussi influencés par les conditions environnementales (Dorman, 1991), des conditions osmotiques (Higgins



*et al.*, 1988), le ratio [ATP]/[ADP] (Hsieh *et al.*, 1991), les domaines chromosomiques et les ancrages à la membrane (Pettijohn, 1996).

Hormis les ADN topoisomérases, d'autres protéines influencent la structure de l'ADN : FIS (*Factor for inversion stimulation*) un activateur qui répond au surenroulement (Schneider *et al.*, 2000), HU (*Heat-unstable nucleoid protein*) la protéine qui se lie à l'ADN la plus abondante, H-NS (*Histone-like nucleoid structuring protein*) qui, comme HU, se lie à des séquences non-sécifiques et préfère l'ADN courbé et IHF (*integration host factor*) qui reconnaît des séquences précises d'ADN (Pettijohn, 1996).

### 1.3.2. Rôle et définition des ADN topoisomérases

La première topoisomérase a été découverte par Wang, il y a une trentaine d'années (Wang, 1971). Les topoisomérases sont bien caractérisées chez plusieurs organismes eucaryotes et procaryotes et font parties des protéines les plus conservées chez les organismes vivants : par exemple, on a retrouvé une topoisomérase IA chez tous les génomes séquencés à ce jour (Wang, 2002).

Les ADN topoisomérases permettent de réguler le niveau de surenroulement du chromosome bactérien. Elles ont également comme fonction la caténation et la décaténation nécessaire à la séparation des chromosomes. La coupure de l'ADN par les topoisomérases est accompagnée par la formation d'un lien phosphodiester transitoire entre un résidu tyrosine de l'enzyme et une des extrémités de l'ADN coupé. On peut diviser les topoisomérases en deux catégories : les topoisomérases de type I et les topoisomérases de type II. Celles de type I coupent un brin d'ADN à la fois pour modifier le niveau de surenroulement d'un tour à la fois, tandis que celles de type II coupent les deux brins d'ADN à la fois

ce qui permet de modifier le niveau de deux tours à la fois. Ces deux types de topoisomérases peuvent être regroupés en quatre sous-groupes : IA, IB, IIA et IIB.

Tableau I. Description des types d'ADN topoisomérases d'*Escherichia coli*

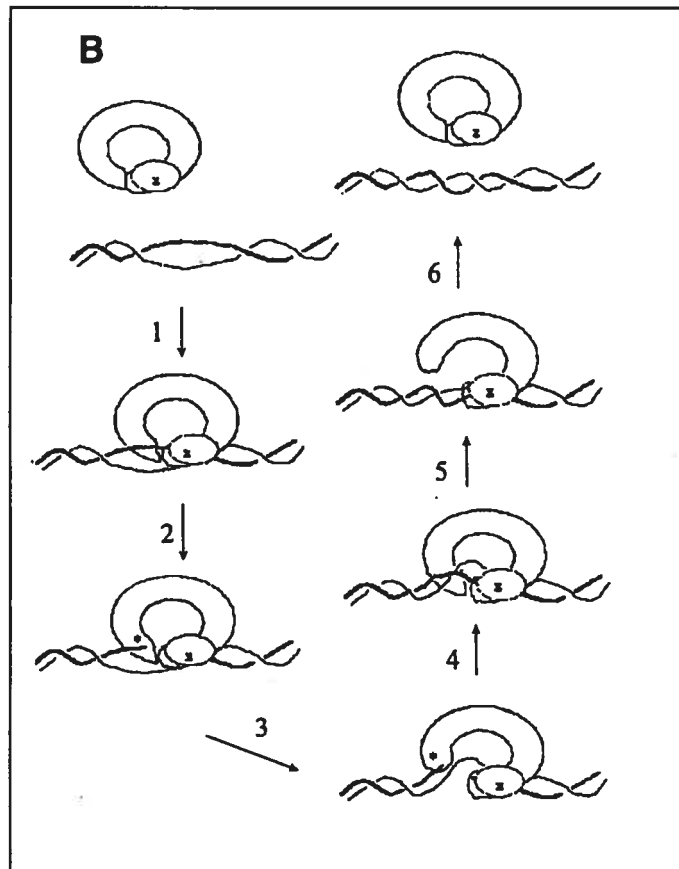
Enzymes	Types	Gènes	Taille (acides aminées)	Cofacteurs	Structure des sous-unités
Topoisomérase I	IA	<i>topA</i>	865	Mg <sup>2+</sup>	monomère
Gyrase	IIA	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>	875 804	ATP, Mg <sup>2+</sup>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> hétérotétramère
Topoisomérase III	IA	<i>topB</i>	653	Mg <sup>2+</sup>	monomère
Topoisomérase IV	IIA	<i>parC</i> , <i>parE</i>	752 630	ATP, Mg <sup>2+</sup>	C <sub>2</sub> E <sub>2</sub> hétérotétramère

Il existe quatre enzymes connus régulant le surenroulement de l'ADN chez *Escherichia coli*. Bien que certaines fonctions semblent redondantes, elles ont toutes leurs fonctions bien précises. La topoisomérase I relaxe l'ADN surenroulé négativement surtout lors de la transcription. La gyrase est la seule enzyme capable de générer du surenroulement négatif en utilisant l'ATP, cette enzyme est donc responsable de la génération de supertours négatifs et, à l'aide de la protéine Muk, est responsable de la condensation du chromosome. La topoisomérase III est une enzyme qui est responsable de la décaténation de l'ADN surtout près de la fourche de réplication tandis que la topoisomérase IV, responsable aussi de la décaténation, agit loin de la fourche de réplication. Cette dernière enzyme relaxe aussi les supertours

négatifs dans la cellule avec la topoisomérase I en opposition avec la gyrase (Champoux, 2001).

Chez les topoisomérases de type IA la coupure de l'ADN est accompagnée par un lien covalent d'un bout de l'ADN au site actif tyrosine de l'enzyme par un lien 5' phosphodiester. Les plasmides contenant des supertours négatifs sont des substrats pour la réaction de relaxation des topoisomérases de type IA par contre, la résolution des supertours négatifs n'a pas lieu entièrement, ils sont résolus jusqu'à un niveau acceptable. Ces enzymes, pour effectuer leurs fonctions, ont besoin d'une région d'ADN simple brin. Elles peuvent catalyser la formation et la résolution de nœuds de plasmides d'ADN simple brin. Elles possèdent trois domaines : le premier domaine N-terminal contient le site actif tyrosine et permet la coupure de l'ADN et le passage du brin; le deuxième domaine,  $Zn^{2+}$  contient trois motifs tétracystéine et son rôle demeure encore inconnu; le domaine C-terminal est riche en acides aminés basiques et dicte la préférence pour l'ADN simple brin (Champoux, 2001).

La coupure par les topoisomérases de type II implique un lien covalent phosphotyrosine entre chacune des sous-unités du dimère et le bout 5' de l'ADN. Ces enzymes contrairement à celles de type I, se lient à l'ADN double brins. Pour effectuer la réaction, un changement conformationnel des sous-unités doit avoir lieu afin de séparer les deux bouts de l'ADN pour créer une ouverture et permettre le passage des brins. Un site arginine est impliqué dans la réaction avec le site actif tyrosine de l'enzyme. Ce dernier site est situé dans un motif hélice-boucle-hélice. Ces topoisomérases possèdent également trois domaines. D'abord, un domaine N-terminal qui contient le site actif tyrosine, le premier ainsi que le deuxième domaine est nécessaire à la liaison et la coupure de l'ADN. Le domaine C-terminal est important pour les cibles de l'enzyme et les interactions avec d'autres protéines (Champoux, 2001).



**Figure 10.** Représentation de la réaction effectuée par la topoisomérase I  
 (1) l'enzyme se lie à une région d'ADN simple brin (2) il y a coupure de l'ADN et formation du lien phosphodiester (3) le domaine III de l'enzyme s'éloigne pour permettre le passage de l'autre brin (4) il y a religation du brin d'ADN coupé (5) dissociation du domaine III de l'enzyme avec l'ADN (6) dissociation de l'enzyme avec l'ADN.

Adapté de Tse-Dinh, Y.C. 1998. Bacterial and archeal type I topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 1400:19-27

Chez *E. coli*, la topoisomérase I est codée par le gène *topA*, situé à la 28<sup>e</sup> minutes sur le chromosome, entre deux gènes bien connus : *cysB*, un activateur et *trp*, codant pour la production de tryptophane. La topoisomérase I est un enzyme de 865 acides aminés et d'une masse moléculaire de 97 kDa, (Wang, 2002). Cette enzyme a été cristallographiée en 1994 et on sait depuis ce temps qu'elle possède quatre domaines distincts lui permettant d'interagir avec l'ADN double brins (Lima *et al.*, 1994). Ce sont les sous-domaines I et III qui se lient à la double hélice d'ADN, le domaine III possédant le site actif tyrosine permettant la réaction de clivage de l'ADN (Tse-Dinh, 1998). La topoisomérase I répond à un excès de surenroulement et relaxe l'ADN. Le gène *topA* est contrôlé par plusieurs promoteurs qui réagissent à des facteurs sigma différents; par exemple  $\sigma^{70}$ , le facteur sigma des gènes constitutifs;  $\sigma^{32}$ , le facteur sigma sensible au choc thermique et  $\sigma^s$ , le facteur sigma de la phase stationnaire. En plus d'être impliqué dans le contrôle du surenroulement, l'enzyme est surtout impliqué dans l'inhibition de la formation de R-loops (hybrides ARN-ADN), ce que nous verrons dans la section topologie de l'ADN et expression génique.

Cette dernière protéine est essentielle à la fonction des cellules car une délétion, qui amène une augmentation du niveau de surenroulement de l'ADN, ne permet pas la survie des cellules (DiNardo *et al.*, 1982). Donc, un mutant *topA* seul n'est pas viable. En revanche, une mutation compensatoire dans l'un des gènes de la gyrase permettra la croissance de ces cellules. Le niveau de surenroulement global sera moins négatif qu'une cellule de type sauvage dû à l'activité réduite de la gyrase (Pruss *et al.*, 1982).

La gyrase qui introduit des supertours négatifs dans l'ADN est codée par les gènes *gyrA* et *gyrB*. La sous-unité *gyrB*, 95 kDa, hydrolyse l'ATP nécessaire à la réaction. Comme la gyrase utilise l'ATP pour introduire des supertours négatifs, les niveaux énergétiques de la cellule peuvent jouer un rôle important dans la régulation des niveaux de surenroulement. En effet, la gyrase est contrôlée non pas par la concentration d'ATP libre mais par le ratio  $[ATP]/[ADP]$  (Hsieh *et al.*, 1991). Le surenroulement d'ADN en lui-même est aussi important pour contrôler l'expression des gènes de la gyrase (Menzel et Gellert, 1994; Drlica, 1984). Cette enzyme est la cible de plusieurs antibiotiques comme la quinolone (comprend la ciprofloxacine), la novobiocine et la microcine B17 (Couturier *et al.*, 1998; Heddle *et al.*, 2001). Certaines mutations *gyr* sont viables et son surenroulement global est moins négatif que celui de type sauvage. D'autre part, la perte de l'activité de la gyrase par une mutation *null* de *gyrB* résulte en un phénotype létal (Pruss *et al.*, 1982).

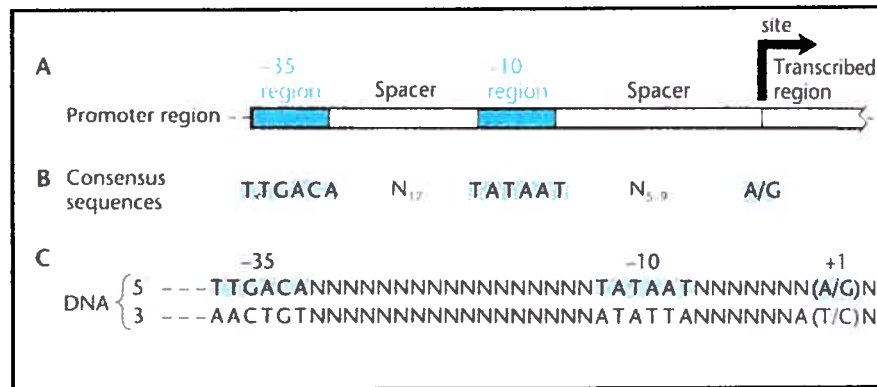
### 1.3.3. La topologie de l'ADN et l'expression génique

Les bactéries d'une même souche possèdent toutes le même génome mais se distinguent par la spécificité de leur composition en protéines pour répondre aux modifications de leur environnement. La régulation génique sert principalement à s'ajuster aux modifications de l'environnement; à la présence de nutriments et l'optimisation de l'utilisation des ressources.

La transcription d'un gène peut être divisée en quatre étapes : la reconnaissance des séquences promotrices, l'initiation, l'élongation et la terminaison. La transcription d'un gène est initiée lorsqu'il y a reconnaissance par l'ARN polymérase d'une région d'ADN nommée promoteur. Puis, il y a la liaison de l'ARN polymérase à l'ADN et la

séparation des brins de l'ADN : une bulle de transcription est créée. L'initiation est la phase qui représente le début de la synthèse de l'ARN. L'ARN polymérase demeure au site du promoteur lors de la synthèse des 9 premiers nucléotides. À cette étape, il y a souvent arrêt et reprise de la synthèse. Cette phase se termine lorsque l'ARN polymérase réussit à synthétiser plus de 9 nucléotides. Puis il y a l'élongation, pendant laquelle l'ARN polymérase se déplace le long de l'ADN en synthétisant l'ARN et où il y a formation d'un hybride ADN-ARN qui aide à maintenir la stabilité de l'ARN polymérase sur l'ADN. À cette étape, le facteur sigma est relâché et l'ARN polymérase continue de synthétiser l'ARN jusqu'à ce qu'elle rencontre un facteur de terminaison et qui lui permet de quitter l'ADN et de relâcher l'ARN nouvellement transcrit.

Deux séquences sont particulièrement importantes dans la région d'un promoteur pour la reconnaissance par l'ARN polymérase : les régions -35 et -10 en amont d'un gène. La distance entre ces deux séquences est bien conservée parmi les différents promoteurs, elle est généralement de 16 à 18 pb. Les promoteurs peuvent être qualifiés comme étant forts ou faibles, selon le taux de transcription initié à partir d'eux. La force du promoteur dépend entre autres de l'affinité de l'ARN polymérase pour les séquences régulatrices et de la capacité de l'ARN pol d'ouvrir les brins d'ADN. Plus les séquences régulatrices sont semblables à une séquence dite consensus, plus le promoteur sera fort et plus le taux de transcription sera élevé. C'est le facteur sigma de l'ARN pol qui localise et se lie à la séquence consensus d'un promoteur pour agir ainsi comme facteur d'initiation. La substitution de sigma dans l'holoenzyme permet de reconnaître des promoteurs différents possédant des séquences consensus différentes.



**Figure 11.** Schéma d'un promoteur

**(A)** Structure typique d'un promoteur bactérien reconnu par  $\sigma^{70}$  avec les régions -10 et -35.

**(B)** Séquences consensus des régions -10 et -35

**(C)** Les séquences consensus par rapport au site d'initiation de la transcription.

Adapté de Snyder, L. and W. Champness. 1997. Molecular genetics of bacteria. ASM press, Washington D.C.

Ce n'est pas seulement la séquence du promoteur qui régule l'expression génique au niveau de l'initiation mais aussi la structure de ce dernier. Pour s'assurer qu'un organisme ait à la fois un métabolisme efficace et une capacité d'adaptation rapide, des mécanismes doivent exister pour coordonner l'expression des gènes à l'environnement. L'expression de certains promoteurs est liée aux conditions environnementales de la cellule à travers la régulation de l'initiation de la transcription par des mécanismes qui sont sensibles au surenroulement. Le surenroulement de l'ADN peut mener à une variété de structures secondaires, comme l'ADN de forme Z (*Z-DNA*), de forme H (*H-DNA*) et cruciforme qui pourraient avoir des fonctions régulatrices (Sinden, 1994). L'énergie de la double hélice peut aider l'ouverture des brins de la région promotrice pour permettre la formation du complexe ouvert. L'énergie nécessaire pour l'ouverture des brins varie d'un promoteur à l'autre. Un changement dans les régions -35 et -10 va permettre une énorme variation dans les caractéristiques d'un promoteur (Sinden, 1994). L'organisation du chromosome en différents domaines topologiques va permettre la possibilité que différents gènes soient surenroulés différemment. Une



modification des conditions de croissance entraîne une altération des densités du chromosome en changeant l'alignement de l'hélice pour la reconnaissance des éléments du promoteur. Ces changements de densités vont permettre une expression différentielle des gènes. Rappelons que le surenroulement global de l'ADN est influencé entre autre par les conditions environnementales (Dorman, 1991), les conditions osmotiques (Higgins *et al.*, 1988) et le ratio [ATP]/[ADP] (Hsieh *et al.*, 1991). En effet, c'est déjà connu que *in vivo* et *in vitro* les fonctions d'un promoteur sont grandement influencées par les niveaux de surenroulement de la matrice d'ADN (Pruss et Drlica, 1989). Le surenroulement a donc le potentiel de réguler l'expression de gènes. Les gènes ont besoin d'un niveau optimal de surenroulement pour permettre leur expression, et ce niveau est différent pour chaque gène (Pruss et Drlica, 1989). De plus, Drlica et son équipe en 1993 ont montré que l'abondance de certaines protéines était modifiée lorsqu'il y avait des altérations dans le niveau global de surenroulement (Steck *et al.*, 1993). Certaines protéines étaient bien sûr à leur maximum d'expression lorsque les niveaux de surenroulement étaient de type sauvage. Par contre, d'autres protéines étaient à leur maximum d'expression lorsque les niveaux de surenroulement étaient plus élevés que les niveaux de type sauvage tandis que d'autres protéines abondaient lorsque les niveaux de surenroulement étaient plus bas que les niveaux normaux. Ils ont également montré que les niveaux de surenroulement de la matrice sont en relation avec la longueur de la région -35 et -10 du promoteur. Ils affirment qu'un long espace entre les régions -35 et -10 avec une torsion plus grande pour un alignement optimal, va permettre au promoteur d'être plus actif à des densités plus grandes de surenroulement parce que les déformations vont réussir à diminuer la torsion. Au contraire, pour une plus petite distance entre les régions -35 et -10, le promoteur est moins actif. Comme mentionné plus haut, le niveau de surenroulement global est finement régulé par la combinaison de plusieurs événements : la

transcription, les protéines qui lient l'ADN, la réplication et bien sûr les topoisomérases (Drlica, 1992; Luttinger, 1995). Regardons plus en détails ces facteurs et leurs influences sur l'expression génique. La transcription peut affecter la structure secondaire de l'ADN. La formation d'ADN-Z en amont d'un promoteur fort a été démontrée *in vitro* (Rahmouni et Wells, 1992). *In vivo*, Krasilnikov *et al.* ont introduit une séquence déjà connue pour entraîner la formation de structures cruciformes, à différentes distances du site d'initiation de transcription d'un promoteur fort. Ils ont mesuré le taux de formation de cette structure cruciforme. Ils ont remarqué une diminution dans la formation de la structure cruciforme lorsque l'insert était entre les positions -50 et -863 par rapport au promoteur *trc*. L'induction de la transcription augmente le niveau absolu de surenroulement négatif jusqu'à des régions très en amont d'un promoteur fort (Krasilnikov *et al.*, 1999).

La transcription a aussi une grande influence sur les niveaux de surenroulement de l'ADN. Selon le « *twin-domain model* » publié par Liu et Wang (Liu et Wang, 1987), lors de la transcription, des supertours positifs sont générés en avant de l'ARN polymérase et des supertours négatifs sont générés à l'arrière. Les supertours générés par cette transcription ne peuvent pas toujours diffuser sur la matrice d'ADN. La gyrase enlève les supertours positifs à l'avant du complexe de transcription et la topoisomérase I enlève des supertours négatifs à l'arrière du complexe.

Le « *twin domain model* » explique aussi les phénomènes qui se produisent lorsque certains promoteurs sont placés de façon convergente ou divergente. Dans le cas de la transcription convergente, lorsque les deux gènes sont transcrits simultanément le surenroulement négatif généré lors de la transcription à l'arrière du premier gène est annulé par le surenroulement positif généré à l'avant du deuxième. Par contre, lorsque

deux gènes sont placés de manière opposée sur la matrice d'ADN et qu'ils sont transcrit simultanément, les supertours générés par la transcription s'accumulent. Les supertours ne sont pas en mesure de diffuser dû à l'autre complexe de transcription (Liu et Wang, 1987). La tension du surenroulement à différents sites dans les régions transcrites peut grandement osciller, cet effet diminue rapidement avec l'augmentation de la distance du site de transcription (Drolet *et al.*, 1994).

Il existe dans la littérature quelques exemples de promoteurs sensibles au niveau de surenroulement. La transcription du gène *tet*, qui code pour la résistance à l'antibiotique tétracycline sur le plasmide pBR322 crée du surenroulement négatif à l'arrière du complexe, ce qui activerait la transcription du promoteur *leu-500* (Chen *et al.*, 1993 et Tan *et al.*, 1994). Des domaines de surenroulement négatifs localisés peuvent être générés en amont de promoteurs activement transcrits. Il y aurait donc un couplage entre les deux promoteurs divergents *tet* et *leu-500* (Mojica et Higgins, 1996).

Le régulon *ilv* codent pour des gènes de structures permettant la synthèse des acides aminés L-isoleucine, L-valine et L-leucine. L'expression de ces gènes est coordonnée d'une manière complexe. *ilv* contient 15 gènes de structures répartis en 5 opérons. Trois de ces opérons (*ilvGMEDA*, *ilvBN* et *ilvABCD*) sont contrôlés par des systèmes d'atténuation de la transcription qui répondent à des produits intermédiaires dans la cellule. En revanche, deux autres opérons (*ilvIH* et *ilvYC*) sont régulés par des mécanismes spécifiques à ces opérons et qui impliquent les produits des gènes (Hatfield et Benham, 2002).

*ilvYC* contient deux gènes, *ilcY* et *ilvC*, disposés de façon divergente et dont les promoteurs se chevauchent. IlvY, le produit du gène *ilvY*, est le régulateur spécifique qui va se lier à la région -35 et entraîner une courbure dans l'ADN. Il agit comme un senseur du produit IlvC et ajuste

continuellement son expression. Sa liaison seule à l'opérateur n'est pas suffisante pour activer la transcription de *ilvC*. Hatfield *et al.* ont donc enquêté en profondeur sur les mécanismes qui régulaient cet opéron. Ils ont découvert que l'activation de la transcription de *ilvC* a besoin d'un co-inducteur ( $\alpha$ -acétolactate ou acéto- $\beta$ -hydroxybutyrate) qui amène des changements conformationnels du complexe IlvY-ADN. Ce co-inducteur de *ilvY* amène un changement dans la courbure de l'ADN qui remodule la région -35 de *ilvC* et augmente l'affinité de l'ARN polymérase par un facteur de 100. L'expression de *ilvC* est donc augmentée par l'addition d'énergie locale de surenroulement, cette énergie est fournie par la transcription divergente (Rhee *et al.*, 1999; Opel *et al.*, 2001a).

L'exemple de l'opéron *ilvYC* démontre que la régulation de l'initiation de la transcription par des protéines qui déplacent l'énergie de surenroulement est possible. Une certaine région d'ADN peut être retenue dans une forme particulière par la liaison d'une protéine et cette liaison peut provoquer un changement de surenroulement à un site adjacent. Si la liaison de protéines survient dans une région voisine d'un promoteur, il peut même y avoir activation de l'initiation de la transcription pour faciliter la formation d'un complexe ouvert (Hatfield et Benham, 2002).

Cet exemple démontre qu'il est possible d'avoir une combinaison transcriptionnelle en absence d'ancrage à la membrane et l'importance du surenroulement négatif généré à l'arrière du promoteur divergent. L'importance du surenroulement transcriptionnel induit est proportionnelle à la force des promoteurs et la longueur des transcrits. Le niveau de surenroulement négatif dans la région d'un promoteur divergent est égale à la somme du surenroulement local généré par la transcription et le surenroulement global de la matrice, donc une diminution de la transcription des deux promoteurs devrait réquerir une augmentation compensatoire au niveau du surenroulement global pour maintenir la transcription maximal des deux promoteurs (Opel et Hatfield, 2001b).

Les protéines qui lient l'ADN peuvent avoir une influence au niveau de l'expression génique. L'opéron *ilvGMEDA* est activé par la liaison du régulateur global IHF à des séquences activatrices situées en amont de l'opéron (UAS pour *Upstream Activator Sequences*). L'activation n'est pas due à l'interaction entre IHF et l'ARN polymérase et ce n'est pas non plus la conséquence de la courbure de l'ADN. L'initiation de la transcription est due aux mécanismes de surenroulement (Sheridan *et al.*, 2001 et Hatfield et Benham, 2002).

*leuV* est un autre opéron connu pour être sensible à une protéine qui influence le surenroulement. FIS se lie à un site UAS en amont de l'opéron *leuV*. La liaison de FIS à ce site situé à -71 pb augmente l'affinité de l'ARN polymérase par un facteur de 3 (Ross *et al.*, 1999). L'opéron *leu* est activé par un mécanisme qui serait similaire à celui de *ilvGMEDA*. La transcription est activée par deux mécanismes : (1) la stabilisation du complexe par des interactions avec la sous-unité alpha de l'ARN pol, (2) l'augmentation de la formation du complexe de transcription en déplaçant l'énergie du surenroulement situé en amont vers le promoteur. Par ailleurs, les mécanismes de *ilvYC* et *ilvGMEDA* ont les mêmes effets, ils assurent un apport d'énergie de surenroulement additionnel aux régions promotrices pour diminuer l'énergie d'activation pour la formation du complexe ouvert et ainsi augmenter l'initiation de la transcription (Opel *et al.*, 2001a).

FIS est également connu pour activer la transcription du promoteur *tyrT* en augmentant la liaison de l'ARN polymérase, la formation du complexe ouvert et la transcription critique des premières bases du promoteur (Muskhelishvili *et al.*, 1997). Muskhelishvili et son équipe ont également démontré en 1997 que FIS entraînait la formation de microdomaines par courbure de l'ADN. Lorsqu'on est en présence de régions d'ADN plus courtes, les courbures peuvent être plus prononcées et il peut y avoir du surenroulement plectonémique (surenroulement de l'ADN positif ou négatif autour de lui-même) (Schneider *et al.*, 1997; Travers *et al.*, 2001).

Comme le surenroulement d'ADN influence l'expression génique, il est normal de supposer également que les topoisomérases influencent aussi l'expression des gènes. La topo I joue un rôle lors de la transcription en empêchant la formation d'hybrides ARN-ADN; les R-loops. Le R-loop est un hybride ARN-ADN se formant durant l'élongation de la transcription entre le brin d'ARN naissant et le brin d'ADN matrice, laissant le brin complémentaire non apparié. Si les R-loops persistent, ils peuvent empêcher les autres ARN polymérases d'avancer sur la matrice, surtout s'il s'agit de gènes activement transcrits (opérons ribosomaux) et inhiber la croissance de la cellule (Hraiky *et al.*, 2000). La portion ARN de cet hybride, qui est un problème majeur en l'absence de *topA*, peut être dégradé par l'endoribonucléase RNaseH (Drolet *et al.*, 1995). La RNaseH a un rôle potentiel de régulation dans le surenroulement au niveau de l'élongation de la transcription (Hraiky *et al.*, 2000).

C'est déjà établi qu'il y a un rôle important du surenroulement dans la régulation de l'expression génique au niveau de l'initiation de la transcription mais les travaux de Drolet *et al.* montrent qu'il y aurait un autre niveau de modulation de l'expression au niveau de l'élongation de la transcription. La topoisomérase I a comme substrat des régions d'ADN simple brin près des régions d'ADN double brins. Un niveau de surenroulement négatif promouvoit l'ouverture des brins et la formation de ces structures donc, le processus d'élongation de la transcription est un « *hot-spot* » pour l'activité de la topo I (Tse-Dinh, 1998 et Wang, 1996). Ces régions sont aussi le lieu de formation des R-loops (Drolet *et al.*, 2003). Plusieurs études appuient ces affirmations : tout d'abord, Massé *et al.* en 1997 (Massé *et al.*, 1997) remarquent que la topoisomérase I régule la formation des R-loops lors de la transcription de l'opéron *rnbB*. Ensuite, ils constatent que la fonction essentielle de la topo I est de relaxer le surenroulement dû à la transcription (Massé et Drolet, 1999b). La topo I a également comme fonction d'inhiber la formation de R-loop en relaxant le

surenroulement négatif généré lors de la transcription. L'accumulation de supertours négatifs en absence de topoisomérase I peut mener à la formation de R-loops et ces derniers peuvent entraîner l'arrêt de l'élongation de la transcription (Massé et Drolet, 1999a; Hraiky *et al.*, 2000). Le couplage de la transcription et de la traduction préviendrait la formation des R-loops (Massé et Drolet, 1999a). De plus, un article récent indique que la topo I interagit directement avec le complexe de l'ARN polymérase (Cheng *et al.*, 2003). L'interaction protéine-protéine implique la sous-unité  $\beta'$  de l'ARN polymérase et le domaine C-terminal de la topoisomérase I. Cette interaction directe pourrait aider à diriger la topoisomérase I au site de transcription où ses activités sont en demande.

#### 1.3.4. La topologie de l'ADN et les gènes de virulence

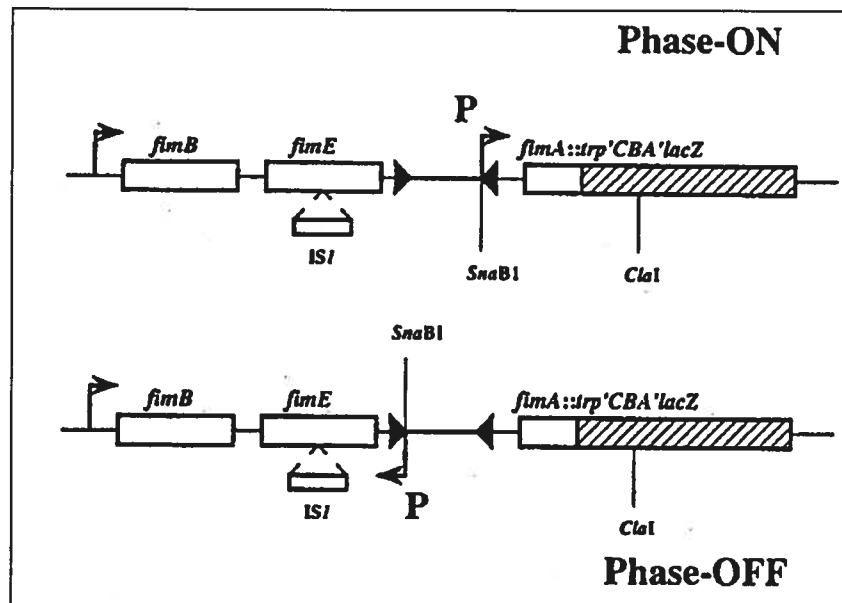
En 1993, Bhriain et Dorman réalisent des mutants *topA* de *Shigella flexneri* où les effets de cette mutation chez *S flexneri* sont similaires aux effets de mutations de *topA* chez *E. coli* ou encore *Salmonella* (surenroulement global plus positif que le type sauvage). Ils ont de plus constaté encore une fois qu'une mutation dans le gène de *topA* altère l'expression des gènes de virulence chez cette souche. Une des particularités était que le gène *topA* de *E. coli* était en mesure de compenser pour le mutant *topA* de *S flexneri* mais curieusement le mutant *topA* de *S flexneri* ne semblait pas en mesure d'acquérir des mutations compensatoires (Bhriain et Dorman, 1993).

Le gène de la topo I a récemment été suggéré pour être impliqué dans la virulence de deux bactéries soit : *Staphylococcus aureus* (Saïd-Salim *et al.*, 2003) et *Escherichia coli* (Dozois *et al.*, 2002). Dans le premier article, ils démontrent à l'aide d'un «genome array» que Rot qui est un régulateur global de la transcription de nombreux gènes de virulence et stimule

l'expression d'un homologue de *topA*. Dans le second article, ils voulaient identifier les gènes exprimés dans les tissus de poulet infectés par une souche aviaire pathogénique. Ils ont réussi à identifier, à l'aide de la méthode SCOTS, le gène *topA* dans les sacs à air des poulets infectés. Dans ces deux articles, le gène de la topoisomérase I est exprimé en condition de stress.

Le cas qui nous intéresse grandement est celui de Dove et Dorman où ils ont étudié les effets de changement dans les niveaux de surenroulement *in vivo* sur l'expression du gène *fimA* d'*Escherichia coli* (Dove et Dorman, 1994). Cet opéron, à l'instar de l'opéron *pap*, est connu pour interagir avec des régulateurs globaux tels que IHF, HNS, et Lrp et il répond aux conditions environnementales comme la température et la composition du milieu. Cet opéron contient le gène *fimA* qui code pour l'expression du fimbriae de type I, le gène *fimB*, d'orientation convergente par rapport à *fimA*, qui code pour la recombinase catalysant la formation de l'inversion de phase (ON ou OFF) du promoteur *fimA* et le gène *fimE* d'orientation divergente par rapport à *fimA* qui code pour une autre recombinase. Lorsque le système est en phase ON, la transcription se fait vers la droite et *fimA* est transcrit, tandis que lorsque le système est en phase OFF, la transcription se fait vers la gauche et *fimE* est transcrit. Pour tester l'effet du surenroulement sur cet opéron, ils ont créé des changements de surenroulement par inactivation du gène *topA* en insérant un transposon ou encore par inhibition de la gyrase en ajoutant de la novobiocine; ces changements étaient vérifiés par des plasmides-rapporteurs qui donnaient des indications de la situation globale du surenroulement.





**Figure 12.** Variation de phase de l'opéron *fim*

Adapté de Dove, S.L., and C.J. Dorman. 1994. The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit gene of *Escherichia coli* is sensitive to changes in DNA supercoiling. *Mol Microbiol* 14:975-988.

Ils ont découvert que la transcription du promoteur *fimA* n'était pas perturbée par des changements dans les niveaux de surenroulement par contre, la variation de phase était affectée. Lorsqu'il y avait une inactivation de *topA* qui augmentait les niveaux de surenroulement, la variation de phase de *fimA* de OFF à ON était diminuée de 30% et de ON à OFF de 90% par rapport à des niveaux de type sauvage. Ils ont conclu qu'il y avait un rôle clé de la topoisomérase I dans le fonctionnement normal de ce système. L'expression du gène *fimB* était affectée par des changements de surenroulement : les niveaux ARN messagers de *fimB* étaient réduits de 50% dans des souches *topA* ::Tn10. La transcription de ce gène est influencée par les niveaux globaux de surenroulement. Lorsqu'il y a inhibition de la gyrase, il y a aussi un effet sur la transcription : le promoteur de *fimB* a une préférence pour l'ADN plus relaxé.

Dove et Dorman proposent donc un modèle pour expliquer l'expression de cet opéron : en phase ON, les supertours positifs générés à l'avant du complexe de transcription par la transcription de *finA* sont en mesure de diffuser et en phase OFF, les supertours négatifs générés à l'arrière du complexe par la transcription divergente ne sont pas en mesure de diffuser à cause de la liaison de IHF. Les phases ON et OFF pourraient être distinguées par les différents degrés de surenroulement. Ceci permet la formation de domaines de topologie d'ADN distincts qui permettraient l'interaction avec différentes topoisomérases.

## Problématique

La topologie de l'ADN, régulée par l'action des topoisomérases, est un déterminant important du contrôle global de l'expression génique. La variation de la topologie de l'ADN pourrait constituer un mécanisme de régulation de l'expression des gènes de virulence chez certains pathogènes (Dove et Dorman, 1994).

L'adhésine fimbriaire F165<sub>1</sub>, codé par l'opéron *foo*, est un des facteurs de virulence synthétisé par les souches d'*E. coli* 4787 et 5131 (O115:F165<sub>1</sub>), est importante car elle permet la survie et la colonisation extra-intestinale des bactéries chez le porc. Cet opéron code pour neuf protéines impliquées dans l'expression et l'assemblage du fimbriae et deux protéines régulatrices (Fool et FooB). La caractérisation des régions régulatrices de l'opéron du fimbriae F165<sub>1</sub> démontre une organisation similaire à la région de régulation de l'opéron du fimbriae Pap (Harel *et al.*, 1992b).

L'expression de ce fimbriae est influencée par les conditions environnementales telles que la disponibilité des nutriments, l'osmolarité et la température (Daigle *et al.*, 1997). Le niveau de surenroulement de l'ADN régulé par les topoisomérases pourrait influencer directement l'expression des protéines régulatrices de l'opéron *foo*. Des études précédentes obtenues à l'aide de fusions transcriptionnelles avec le gène *lacZ* sur des souches isogéniques indiquent que l'expression de *fooB* est fortement diminuée en absence de la topoisomérase I, enzyme responsable de la relaxation du surenroulement négatif chez les bactéries. Pour confirmer ces résultats, cette étude sera réalisée au niveau de l'ARN messager. De plus, nous étudierons la possibilité que la topo I agisse indirectement sur l'expression de l'opéron, via l'expression de régulateurs

globaux tels que Lrp et CRP, ou encore par méthylation de l'ADN, des facteurs déjà connus pour contrôler l'expression de ces adhésines.

Il est intéressant de souligner que les deux gènes *fooB* et *fooI*, codant pour les protéines régulatrices de l'opéron sont disposés de façon divergente sur le chromosome. Nous étudierons l'impact de la transcription divergente de *fooI* sur le gène *fooB*; en utilisant des fusions géniques dans lesquelles seul le promoteur de *fooI* est présent. Puis, pour mieux comprendre les effets du surenroulement local par rapport au global sur l'expression de *fooB*, un promoteur fort *ptrc* sera substitué à *fooI* et son effet transcriptionnel sur *fooB* sera évalué.

Ce projet nous permettra de confirmer notre hypothèse que le surenroulement local d'ADN influence directement l'expression de *fooB*. Le projet est donc d'une très grande importance car le surenroulement local pourrait être un facteur important de contrôle de l'expression de gènes. Ainsi donc, une meilleure compréhension des mécanismes de régulation qui dirigent l'expression des facteurs de virulence, non seulement *in vitro* mais aussi temporellement et spatialement à l'intérieur de l'hôte permettra le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour contrer les infections extra intestinales d'*E. coli* chez le porc.

## SECTION II- Article

**DNA supercoiling and topoisomerases in F165<sub>1</sub> fimbriae expression  
in the pathogenic *Escherichia coli* 4787 strain.**

Marie-Catherine Tessier<sup>1&</sup>, Julie Annick Desabrais<sup>2&</sup>, Christine Martin<sup>3</sup>,  
Josée Harel<sup>1\*</sup> and Marc Drolet<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Département de pathologie et microbiologie, Université de Montréal, C.P.  
5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

<sup>2</sup>Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal,  
C.P. 6128, Succursale centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>3</sup>Laboratoire de microbiologie, INRA Clermont-Ferrand-Theix, 63122 St-  
Genès-Champanelle, France

\*Corresponding authors:

Marc Drolet ([marc.drolet@umontreal.ca](mailto:marc.drolet@umontreal.ca))

Josée Harel ([Josee.harel@umontreal.ca](mailto:Josee.harel@umontreal.ca))

& These authors contributed equally to the work.

Running title: DNA topoisomerases in Fimbriae Expression

### **Abstract**

*Escherichia coli* 4787 (O115:KV165) is a pathogenic strain which causes septicaemia in pigs. The strain expresses fimbriae F165<sub>1</sub> (P-like) encoded by the *foo* operon, that belong to the P fimbrial family. F165<sub>1</sub> is known to play a major role in the pathogenesis process. FooB, the first member of the *foo* operon, together with Fool are involved in the regulation of F165<sub>1</sub> synthesis. Interestingly, Fool and FooB are divergently transcribed and their intergenic region, containing putative binding sites for global regulators such as Lrp and CRP and sequences for methylation by Dam, is responsible for the regulation of *foo* operon expression. The goal of our study was to verify if both global and local supercoiling (transcription-induced supercoiling within the intergenic region) can affect the regulation of *foo* expression. In order to study the influence of DNA supercoiling on *foo* operon expression, we constructed chromosomal *lacZ* fusions with the *fooB* gene and used a set of isogenic strains, allowing us to modulate both global and local supercoiling. We show here that the expression of *fooB* is significantly perturbed when global negative supercoiling is reduced by a mutation which decreases DNA gyrase activity. A deletion of the *topA* gene, encoding for topoisomerase I which can relax transcription-induced negative supercoiling, further reduced *fooB* expression. These results suggest that both global and transcription-induced supercoiling can significantly affect *fooB* expression. Moreover, Fool, a positive regulator of *fooB* expression, has no effect on *fooB* expression in the *topA* null mutant.

We also show that divergent transcription from a strong promoter can significantly enhance *fooB* expression and compensate for the absence of *Fool* in a wild-type strain.



## Introduction

F1651 fimbriae is produced by *Escherichia coli* 4787, a strain which is associated with septicemia in pigs, and is involved in the pathogenesis process (1, 2). The F1651 adhesin from *E. coli*, encoded by the *foo* operon, belongs to the family of Pap-related fimbriae. The expression of *foo* is controlled at the transcriptional level by two superimposed mechanisms which modulate, on one hand, the percentage of cells producing fimbriae in a single colony (phase variation) and, on the other hand, the amount of antigen at the surface of a single cell (steady state transcription; ref. 3, 4). As in Pap (see ref. 5 for a recent review), the F1651 expression is mediated by regulatory proteins such as Lrp, Dam methylase, and by Fool and FooB, the PapI and PapB homologues, respectively (3). Fool is encoded by the *fool* gene which is divergently transcribed with respect to *fooB*, the first gene of the *foo* operon (3). Similar to the *pap* operon, there are two 102 bp-spaced GATC sites within the intergenic region between *fool* and *foo* operon (Fig. 1). Considering the high degree of similarity of its homology with PapI, it is possible that Fool may interact with Lrp for the activation of *foo* transcription (5 and references therein). The presence of regulatory sites for global regulators together with the fact that *fool* and *fooB* are divergently transcribed, may suggest an important role for DNA supercoiling in *foo* operon expression. Indeed, both global supercoiling, which reflects the average superhelical

density of all supercoiling domains, and local supercoiling, which is generated in the wake of moving RNA polymerases during transcription (6), have been recognized as important determinants for gene expression (see ref. 7 for a recent review). In *Escherichia coli*, the global supercoiling level is mainly regulated by DNA gyrase, which is composed of two subunits encoded by the *gyrA* and *gyrB* genes. The supercoiling activity, in turn, influenced by the cellular ATP/ADP ratio (8). DNA topoisomerase I, which relaxes negative supercoiling, plays at best only a minor role in the regulation of global supercoiling, but is responsible for regulating transcription-induced negative supercoiling (9). In order to study the influence of DNA supercoiling on *foo* operon expression, we constructed chromosomal *lacZ* transcriptional fusions with the *fooB* gene and used a set of isogenic strains, allowing us to modulate both global and local supercoiling. The results presented here show that both global and transcription-induced supercoiling (local) can significantly affect *fooB* expression. Our results suggest that DNA topology within the *foo/B* intergenic regions can significantly affect the multiple protein-DNA interactions that must take place in order to properly regulate *foo* expression.

## **Experimental Procedures**

*Bacterial strains and plasmids.* The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. P1*vir* transduction (10) was used to introduced the  $\Delta(\text{argF-lac})\text{U169 zah735::Tn10}$  region into strains DM800, EM205 and EM209 to obtain, respectively, PH617, PH615 and PH613. The chromosomal *lac* fusions (Fig. 3) were obtained by using the system described by Simons *et al.* (13). Pfu polymerase (Stratagene) was used for PCR to obtain various DNA fragments from *Escherichia coli* strain 4787 carrying the *foo* operon (3). The PCR-generated fragments, that were all sequenced, were inserted into pGEM-T before cloning them into the *Bam*HI site of pRS551 to generate the *lac* fusions. To obtain fusion 1 (*fooB-lac*), a 1039 bp DNA fragment with *Bam*HI and *Bgl*II ends was generated by PCR with 5'GGATCCTTTTATCTGTTTCAGT3' and 5'AGATCTAAGGGCTTCTTTTTTTT3' primers. For fusion 2 (*fooP-fooB-lac*), a 776 bp DNA fragment with *Bam*HI and *Bgl*II ends was generated by PCR with 5'GGATCCGTATTCACTCATCTCACTG3' and 5'AGATCTAAGGGCTTCTTTTTTTT3' primers. The PCR fragment with *Bam*HI and *Bgl*II ends carrying the *Ptrc* promoter in fusion 3 (*tetA-trcP-fooB-lac*) and 4 (*trcP-fooB-lac*), was obtained by using pTrc99a (Amersham Biosciences) and, 5'GGATCCGATCTGGTTTGA3' and 5'AGATCTCCGAGCTCGAAT3' primers. In fusion 3, a DNA fragment with *Bam*HI and *Bgl*II linkers carrying the *tetA* gene from pACYC184 without its

promoter, was generated by PCR using 5'GGATCCGCGGTAGTTTAT3' and 5'AGATCTATTCCGTTAGCGAGG3' primers. This fragment was cloned under the control of *P<sub>trc</sub>*, to generate fusion 3. The chromosomal fusions were obtained by using  $\lambda$ RS45 as described (13). Single  $\lambda$ phage integrations were verified by PCR as described by Powell *et al.* (14).

*Media and growth conditions.* LB and M9 minimal media were prepared as described previously (10). LB agar was supplemented with 50  $\mu$ g/ml cysteine and bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) at a final concentration of 40  $\mu$ g/ml. When needed, antibiotics were added to the media at the following concentration: kanamycin, 16.7  $\mu$ g/ml, tetracycline, 3.3  $\mu$ g/ml and chloramphenicol, 10  $\mu$ g/ml. DM800 derivatives carry the *acrA13* mutation (11), rendering them more permeable to many antibiotics. For  $\beta$ -galactosidase assays and RNA extraction the cells were first streaked on LB agar with appropriate antibiotics. Single colonies were used to inoculate liquid M9 minimal medium supplemented with glucose (0.2%), glycerol (0.2%), 40  $\mu$ g/ml L-cysteine, L-arginine, L-proline, L-glycine, L-isoleucine, and L-valine, 20  $\mu$ g/ml uracil and 5  $\mu$ g/ml thiamine. Overnight cultures were diluted (1/20) into M9 minimal medium supplemented with glycerol (0.4%), as the sole carbon source, and the other supplements. Cells were grown to an OD<sub>600</sub> of 0.8 (mid-log phase).

*DNA supercoiling analysis.* Plasmid DNA extractions for supercoiling analysis were done as described (9). One-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine was performed essentially as described in Massé and Drolet (9). Chloroquine was used at 7,5 µg/ml. After electrophoresis, agarose gels were dried and prepared for *in situ* Southern hybridization as described (9).

*β-galactosidase assays.* β-galactosidase activity was measured according to Miller (10).

*RNA extraction.* RNA was extracted by using the TRIZOL reagent (Invitrogen) as described (15).

*Northern Blot.* RNA samples (10 µg) were loaded on 1,2% denaturing agarose gels containing formaldehyde (16). After electrophoresis, the gels were photographed under UV light and the RNA was transferred to nylon membranes (Amersham Biosciences). Hybridization with oligonucleotides took place as described (16). The sequence of the oligonucleotides used for the hybridizations are as follows: *lacZ*, 5'GGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGC CAGTGAATCC3', *Irp*, 5'CGCACACGCTCAAGGCACGGCGTTGGGGAAAGTCCCACACGTTTA GAAAGCTCGACG3' and *crp*,

5'GGCAATGAGACAACCATTCGAGAGTCGGGTCTGTTTGCGGTTTGCC  
AAGCACCC3'.

*Primer Extension. Primer extension analysis with*  
5'GGCAACAGTACGCTCTCG3' primer and 10 µg of RNA were performed  
as described by Hraiky *et al.* (17).

*Calculation of the switch frequency.* Lac<sup>+</sup> to Lac<sup>-</sup> and Lac<sup>-</sup> to Lac<sup>+</sup> transition rates were measured in λMT01 lysogens MT008, MT009 and MT010 as described by Harel *et al.* (4). These strains were first inoculated on LB agar plates containing 50 µg/ml cysteine, 40 µg/ml bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal), 3.3 µg/ml tetracycline and 16.7 µg/ml kanamycin. Following an overnight incubation at 30°C, colonies showing a complete blue (Lac<sup>+</sup>) or white (Lac<sup>-</sup>) phenotype were excised from the agar and resuspended in 1 ml of 0,1 M PBS buffer, pH 7,4. Appropriate dilutions were inoculated onto M9 X-Gal glycerol agar supplemented with 40 µg/ml L-cysteine, L-arginine, L-proline, L-glycine, L-isoleucine, and L-valine, 20 µg/ml uracil, 5 µg/ml thiamine and 16.7 µg/ml kanamycin at 30° C. After 48 hours of growth, the colonies were scored for the LacZ phenotype. Transition rates were calculated by the formula  $(M/N)/g$ , where  $M$  is the number of cells that underwent a phase variation,  $N$  the total number of cells evaluated and  $g$  the total number of generations that gave rise to the colony (for MT008  $g = 25,70$  ; MT009  $g =$

22,82 ; and MT010  $g = 19,51$ ). The weighted average of frequencies was calculated based on the frequency switch of 3 colonies.

## **Results**

### *Effects of DNA supercoiling on *fooB* expression*

To study the effect of DNA supercoiling and topoisomerases on *foo* operon expression, we constructed a set of isogenic strains carrying or lacking mutation(s) within genes encoding gyrase and/or DNA topoisomerase I. Since the starting strain used to construct the two other isogenic ones is DM800, the double  $\Delta topA$  *gyrB225* mutant (11), any other mutations apart from *gyrB225* that may have occurred to compensate for the absence of *topA* (9, 11) will also be present in all strains, thus making them truly isogenic strains. Therefore, differences in *foo* operon expression between the strains can be attributed to specific mutations altering topoisomerase functions and/or supercoiling levels. As can be seen in Fig. 2, the *gyrB225* mutation reduces global negative supercoiling by about 25% as compared to the wild-type isogen. Since it is known that plasmid supercoiling generally reflects chromosomal supercoiling levels (8), we can assume that chromosomal negative supercoiling is also reduced by roughly 25% by the *gyrB225* mutation. The *topA* deletion does not further reduce the negative supercoiling level, as expected since the major function of topoisomerase I is not related to the regulation of global supercoiling. Therefore, differences in *foo* operon expression between *gyrB225* and the double *gyrB225*  $\Delta topA$  mutant have to be attributed to the major function of topoisomerase I which is related to transcription, most likely to relax transcription-induced negative supercoiling (9).



To measure *foo* operon expression, we constructed transcriptional *lacZ* fusions with *fooB*, the first gene of the operon (Fig. 3). The three isogenic strains were subsequently lysogenized with recombinant lambda phages bearing the various *lacZ* fusions and clones carrying a single copy of the fusions were selected for further studies. The first fusion used in our study (Fusion 1, Fig. 3) also contains the complete version of the divergently transcribed *fool* gene, encoding for the positive coregulator of *foo* expression (Fig. 1). As can be seen in figure 4, a lower than wild-type supercoiling level by roughly 25%, reduces *foo* operon expression by about 3 fold (compare 1, wild-type and 2, *gyrB225*). Deleting the *topA* gene, which does not alter global supercoiling, further reduces *foo* operon expression by, again, about 3 fold (compare 2, *gyrB225* and 3,  $\Delta$ *topA gyrB225*). Since under the experimental conditions used in our studies no significant differences in growth rate were noted among the strains, our results of  $\beta$ -galactosidase assays cannot be attributed to growth (data not shown). In order to verify whether such differences in  $\beta$ -galactosidase assays are related to transcription or translation, northern blot experiments were performed by using a probe covering the 5' portion of *lacZ*. The results presented in figure 5 shows that it is related to transcription, since the ratio of *lacZ* signals in the northern blot (compare lane 1, 2 and 3) matches very well the ratio of  $\beta$ -galactosidase assays (Fig. 4). Moreover, to verify that the transcriptional activity of *lacZ* in the different strains is due to initiation from the same promoter and at the same time to map the

transcriptional start site of the *foo* operon, we performed primer extension experiments. Figure 6a shows the result of such an experiment that identifies the transcriptional start site and allows us to recognize typical  $-35$  and  $-10$  signals, with relatively good matches with the consensus sequences (Fig. 1). In Figure 6b, it can be seen that *lacZ* transcription in each of the strains originates from this promoter and that the ratio of primer extension signals (compare lanes 1, 2 and 3) match very well the ratio of  $\beta$ -galactosidase assays (Fig. 4). Next, since global regulators such as Lrp and CAP are known to regulate *foo* operon expression (ref. 3 and Fig. 1), we performed northern blot experiments with appropriate probes to measure *crp* and *lrp* expression in our strains. No differences were noted among these strains (data not shown). Altogether, these results allow us to conclude that both global and local supercoiling can significantly affect *foo* promoter activity.

Since the ON-OFF phase variation of *foo* is controlled by similar regulatory elements that are used to regulate *foo* expression level, it should similarly response to supercoiling fluctuations. To test that, we monitored the ON to OFF and OFF to ON switches by counting white and blue colonies on indicator plates, as described in experimental procedures. Interestingly, different *lac* phenotypes were found. The wild-type strain clearly presented white  $\text{Lac}^-$  colonies and dark blue  $\text{Lac}^+$  colonies. Colonies with different intensities of blue, varying from light to dark, were observed for the *gyrB225* and *topA* null mutants (data not

shown). Because of the different blue gradation of the colonies, the phase variation of the mutants was difficult to characterize. In the *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> wild-type strain MT008, in colonies of both On to OFF and OFF to ON phase transitions, ON state predominated with more than 99% Lac<sup>+</sup> colonies. The OFF to ON switch frequency was around  $4 \times 10^{-2}$ /cell/generation in this strain, whereas the ON to OFF switch frequency was less frequent ( $7,37 \times 10^{-5}$ /cell/generation). As it is for the wild-type F165 strain (4), in strain MT008 ON state colonies were predominant. Consistent with our data on repression of *foo* operon expression by *gyrB225* and *topA* null mutations, we found that phase variation was affected by these mutations.

#### *Fool function is sensitive to supercoiling*

Fool, a PapI homologue, is a positive coregulator of the *foo* operon (Crost *et al.*, unpublished data) that possibly acts by facilitating the interaction of Lrp to activate *foo* expression (Fig. 1; ref. 5). To test if Fool function might be perturbed by changes in DNA supercoiling, we constructed a fusion in which the coding region of *fool*, but not its promoter, has been deleted (fusion 2, Fig. 3). As can be seen in figure 4, deleting *fool* reduces *foo* operon expression by 3 fold in the wild-type strain (compare 1, Fool complete and 4, Fool deleted), as expected if Fool acts as a positive coregulator. In a strain in which global negative supercoiling is reduced by roughly 25% (*gyrB225*), the absence of Fool reduces by at most 2 fold *foo*

expression (compare 2, Fool complete and 5, Fool deleted) whereas it has no effect in the absence of DNA topoisomerase I (compare 3, Fool complete and 6, Fool deleted). When Fool was provided in *trans* from a plasmid, *foo* expression was restored to similar values as those obtained with the fusion carrying the complete *foo/* gene in its natural context (fusion 1; data not shown). This result shows that differences in *foo* operon expression between fusion 1 and 2 is related to the absence of Fool. Overall, these results suggest that DNA topology can impair Fool function, possibly via its effect on Lrp-DNA interactions.

*Strong divergent transcription can fully compensate for the absence of Fool in a wild-type strain*

Since a mutation in *gyrB* considerably reduces *foo* operon expression, negative supercoiling must be high enough in order for *foo* to be correctly expressed. Moreover, the fact that Fool function is abolished in the *topA* null mutant may suggest that appropriate Lrp-DNA interactions are disrupted in the absence of DNA topoisomerase I (see Discussion), and therefore that transcription-induced negative supercoiling, linked to the major function of this enzyme, might be responsible for *foo* expression in this mutant. In addition, since transcription-induced negative supercoiling has been shown to affect DNA transactions even in *topA*<sup>+</sup> backgrounds (18-21), it could possibly modulate *foo* operon expression in wild-type cells. To test this hypothesis, we constructed two additional

fusions (fusion 3 and 4, Fig. 3) in which the *fool* promoter was substituted for the very strong *Ptrc* promoter. In addition, in fusion 3, the *tetA* gene was placed under the control of *Ptrc*. Transcription of this gene has been shown to generate very high levels of negative supercoiling because of the anchorage of the nascent TetA protein to the membrane, that completely blocks the rotation of the transcribing RNA polymerase (22). Transcription from *Ptrc* is therefore expected to generate higher negative supercoiling in fusion 3 than in fusion 4, that only carries *Ptrc*. It is important to note that Fool is not produced in the strains carrying fusion 3 or 4. As can be seen in figure 3, divergent transcription of *tetA* from *Ptrc*, completely restored *foo* expression to its normal level in the wild-type strain (compare lane 7, fusion 3 and lane 1, fusion 1). This result strongly suggests that transcription-induced negative supercoiling can fully compensate for the absence of Fool in the wild-type strain (lane 4, fusion 2). This is also supported by the fact that fusion 4, in which *Ptrc* alone is expected to generate less negative supercoiling, does not activate *foo* expression to the wild-type level (compare lane 7, fusion 3 and lane 10, fusion 4). Also predicted if divergent transcription activate *foo* expression via transcription-induced negative supercoiling, is the fact that the stimulation of *foo* expression is higher in the *gyrB225* strain in which global negative supercoiling is lower (compare lane 2, fusion 1 and lane 8, fusion 3; more than 2-fold stimulation). Transcription-induced negative supercoiling is expected to have a larger impact in the absence of DNA topoisomerase I,

since relaxation of such supercoiling is the major function of this enzyme (9). Two observations support this hypothesis. First, the stimulation of *foo* expression by divergent transcription is higher in the *topA* null mutant than in the isogenic *topA*<sup>+</sup> strains (for example compare lane 3, fusion 1 and lane 12, fusion 4; almost 5-fold stimulation). Second, as opposed to the *topA*<sup>+</sup> strains, divergent transcription from *P<sub>trc</sub>* alone is slightly better than divergent transcription from *P<sub>trc</sub>-tetA* in activating *foo* expression in the *topA* null strain, suggesting that too much of negative supercoiling can be detrimental to *foo* expression.

## **Discussion**

The results presented in this paper clearly show that the level of DNA supercoiling can significantly affect *foo* operon expression. Indeed, either not enough (*gyrB225*) or too much (*topA* null) supercoiling severely impairs *foo* regulation. Since DNA supercoiling is known to fluctuate upon changes in environmental conditions (7, 8), it may have an impact on the synthesis of fimbriae during pathogenesis. However, although the supercoiling level can significantly influence *foo* expression, it does not necessarily mean that it plays a regulatory role. We rather think that the effect of supercoiling on *foo* expression described in the present study is an indication that multiple DNA-protein interactions influenced by DNA topology within the intergenic *foo/B* region must take place in order for the *foo* operon to be properly regulated. Indeed, there are six putative Lrp binding sites within the intergenic region of *foo* that are, based on homology with the *pap* system, likely to be involved in the regulation of *foo* expression. In fact, we have found that *foo* expression is almost completely shut-off in a  $\Delta lrp$  mutant of *E. coli* (3). Interestingly, as it is the case for *pap*, the Lrp binding sites within the putative *foo* regulatory regions are all in phase with respect to the double-helix, being each spaced three helical turns apart (Fig. 1 and ref. 5). In a recent report, it was shown that phase variation in the *pap* system is strictly dependent upon the helical phase of the CAP DNA binding site within the *pap/B*

intergenic region with respect to the *papBA* initiation site (23). There is a putative CAP binding site similarly located within the *foo/B* intergenic region (Fig. 1) and we have previously shown that the CAP protein is involved in *foo* operon expression (3). Therefore, helical phasing seems to be important for *foo* regulation and may explain, at least in part, its high sensitivity to DNA supercoiling fluctuations in both directions, i.e., increased supercoiling (*topA* null) or decreased supercoiling (*gyrB225*). For example, a possible disruption of the helical phasing of Lrp binding sites by supercoiling changes in the *gyrB225* and double *gyrB225 ΔtopA* strains, may impair the cooperative binding of Lrp (5). This would explain why the effect of Fool on *foo* expression can be reduced (*gyrB225*) or even lost (*gyrB225, ΔtopA*).

One interesting finding in this work is the fact that strong divergent transcription can bypass the Fool requirement for *foo* operon expression. This result suggests that above a threshold level, transcription-induced negative supercoiling can directly activate the *foo* operon promoter, i.e. without the need for activators such as Lrp and CAP. There is at least another precedent for promoter activation by transcription-induced negative supercoiling from the strong *P<sub>trc</sub>* promoter. Indeed, it was shown that divergent transcription from *P<sub>trc</sub>* in a *topA* null mutant, can activate the supercoiling-sensitive *leu-500* promoter (24, 25). Later, it was demonstrated that such an activation of the *leu-500* promoter could take place in a *topA*<sup>+</sup> background under specific growth conditions (21).



Whether or not transcription from the divergent *foo/* promoter can stimulate *foo* operon expression in its natural context remains to be seen. However, we found that the promoter of *foo/* is very weak (Desabrais *et al.*, unpublished), which is not surprising, giving the fact that it encodes a specific regulator of transcription. Nevertheless, we believe that the F165<sub>1</sub> fimbriae operon offers a very good system to study the interrelationship between both global and transcription-induced supercoiling and the control of gene expression by global regulators.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) grant 0214 and by the Natural Sciences Engineering Research Council of Canada (NSERC) grants 225155 to M.D. and J.H., and by a NATO grant to C.M.. M.-C.T. was funded by a scholarship from NSERC.

## **References**

1. Ngelaka, M., Harel, J., Jacques, M. and Fairbrother J.M. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 5048-5056.
2. Ngeleka, M., Jacques, M., Martineau-Doize, B., Daigle, F., Harel, J. and Fairbrother, J.M. (1993) *Infect. Immun.* **61**, 836-843.
3. Daigle, F., Forget, C., Martin, C., Drolet, M., Tessier, M. C., Dezfulian, H. and Harel, J. (2000) *Res. Microbiol.* **151**, 563-574.
4. Harel, J., Daigle, F., Forget, C., Tessier, M.C. Crost, C. and Martin, C. (2000) *Can. J. Microbiol.* **46**, 1101-1107.
5. Hernday, A., Krabbe, M., Braaten, B.A. and Low, D.A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Aug. 29, 10.1073/pnas.182427199.
6. Liu, L. F. and Wang, J.C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7024-7027.
7. Opel, M. L., Arfin, S. M. and Hatfield, G. W. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 1109-1115. Drlica, K. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 425-433.
9. Massé, E. and Drolet, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16654-16658.
10. Miller, J. H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
11. DiNardo, S., Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E. and Wright, A. (1982) *Cell* **31**, 43-51.
12. Massé, E., Phoenix, P. and Drolet, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12816-12823.

13. Simons, R. W., Houman, F. and N. Kleckner, N. (1987) *Gene* **53**, 85-96.
14. Powell, B. S., Court, D. L., Nakamura, Y., Rivas, M. P. and Turnbough C.L. Jr. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 5765-5766.
15. Wassarman, K. M. and Storz, G. (2000) *Cell* **101**, 613–623.
16. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
17. Hraiky, C., Raymond, M. A. and Drolet, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 11257-11263.
18. Rahmouni, A. R. and Wells, R.D. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 131-144.
19. Krasilnikov, A.S., Podtelezhnikov, A., Vologodskii, A. and Mirkin, S. M. (1992) *J. Mol. Biol.* **292**, 1149-1160.
20. Opel, M.L. and Hatfield, G. W. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 191-198.
21. Fang, M. and Wu, H.Y. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 29929-29934.
22. Lynch, A. S. and Wang, J. C. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 1645-1655.
23. Weyand, N. J., Braaten, B. A., van der Woude, M., Tucker, J. and Low, D. A. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 1504-1522.
24. Chen, D., Bowater, R. P. and Lilley, D. M. (1993) *Biochemistry* **32**, 13162-13170.
25. Tan, J., Shu, L. and Wu, H. Y. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 1077-1086.

### **Figure legends**

**Figure 1. Nucleotide sequence of a *Bam*H1-*Bgl*II DNA fragment carrying the *foo*/B intergenic region within pRS551** (see Experimental Procedures for details on the cloning procedure). Lrp, CAP and GATC indicate putative sequences for interaction with, respectively, Lrp, CAP and DAM methylase. The identification of such regulatory sites is based on the strong sequence similarity of the *foo* regulatory region with the well-described *pap* operon (see ref. 5). The +1 initiation site of *foo*B has been mapped in this work (see Fig. 6). The *foo*/ +1 initiation site has been determined by Desabrais, Harel and Drolet (unpublished results).

**Figure 2. DNA supercoiling in the bacterial strains used in this study.** pBR322 $\Delta$ *tet*5', a pBR322 derivative with a 5' deletion in the *tetA* gene (9), was extracted from the bacterial strains used in this study and analyzed by agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine, as described in Experimental Procedures. At the chloroquine concentration used, the less negatively supercoiled DNA molecule migrate faster.

**Figure 3. A schematic drawing of the transcriptional fusions used in this study** (see Experimental Procedures for details on their construction). Numbers indicate length in base pairs. +1 indicate transcriptional start

sites. Boxes are for open reading frames (ORFs). *tetA* and *lacZYA* are not drawn to scale.

**Figure 4. The effect of DNA supercoiling on *foo* expression.  $\beta$ -galactosidase assays.** Numbers in % relative to fusion 1 in the wild-type background (100%: 2614  $\pm$ 135 Miller units), represents the mean of at least three experiments. See Experimental Procedures for details and Fig. 3 for the description of the fusions.

**Figure 5. The effect of DNA supercoiling on *foo* expression.** Northern blot analysis by using a probe hybridizing to *lacZ*. See Experimental Procedures for details and Fig. 3 for the description of the fusions.

**Figure 6. The effect of DNA supercoiling on *foo* expression.** Primer extension analysis. A. Mapping of the transcriptional start site of *foo* operon by primer extension. The arrow points to the identified start site. B. Primer extension analysis was performed with the same RNA preparations as those used for the Northern Blot experiment (Fig. 5). See Experimental Procedures for details and Fig. 3 for the description of the fusions.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strains	Description	Reference and source
DM800	$\Delta(topA-cysB)204$ <i>gyrB</i> 225	11
EM205	DM800 <i>topA</i> <sup>+</sup>	12
EM209	DM800 <i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	12
PH613	EM209 $\Delta(argF-lac)U169$ <i>zah735::Tn10</i>	This work
PH615	EM205 $\Delta(argF-lac)U169$ <i>zah735::Tn10</i>	This work
PH617	DM800 $\Delta(argF-lac)U169$ <i>zah735::Tn10</i>	This work
MT008	PH613 $\lambda$ [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT009	PH615 $\lambda$ [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT010	PH617 $\lambda$ [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT067	PH613 $\lambda$ [ <i>foolp-fooB-lacZ</i> ]	This work
MT068	PH615 $\lambda$ [ <i>foolp-fooB-lacZ</i> ]	This work
MT069	PH617 $\lambda$ [ <i>foolp-fooB-lacZ</i> ]	This work
MT070	PH613 $\lambda$ [ <i>tetA-trcP-fooB-lacZ</i> ]	This work
MT071	PH615 $\lambda$ [ <i>tetA-trcP-fooB-lacZ</i> ]	This work
MT072	PH617 $\lambda$ [ <i>tetA-trcP-fooB-lacZ</i> ]	This work
MT073	PH613 $\lambda$ [ <i>trcP-fooB-lacZ</i> ]	This work
MT074	PH615 $\lambda$ [ <i>trcP-fooB-lacZ</i> ]	This work
MT075	PH617 $\lambda$ [ <i>trcP-fooB-lacZ</i> ]	This work

GAATTCCCG**GGATCC**  
 TTTTATCTGTTTCAGTGAAGCATGCCACAGATTGAGTTATTAAGTTGTGGAAGAACAGC  
 TTTGCCCCGCCTGCTTCTCTCCTTTCAGAAACCAGTATGTTGCCATGCCCCGTCTTAATG  
 GTGAGCGCTGAACCATACTGCTTTTTCCAGTAATAACAGGTAATAGCGGGCCTGGTAAT  
 CCGTTACCGCCAGCGCCTCTGCAATTTCTGCAGTTTCCCTCCATTATGCCTGTTTCAGAA  
 ATTCCAGTATTTCAATTCTTCATGTATTCACT**CAT**CTCACTGTAACAAAGTTTCTTCGAAT  
 AATAAAAATCATGCTCTCTGTTATCAACGGAAGGTATTTTTATTCTCTGTATTTGCTTT  
 (-10) (-35)  
 ATTTGCGAAATTTAGTGAATTTGCTTTTTGTTGGCTTTATTTGATGTGTGTGCACATTTTG  
 TGTGTTATTTTTATGTGAAAGGAAAGTCCGTAAAAATGCATTTAGAC**GATC**TTTTATGCT  
 Lrp site 4 **GATC**<sup>dist</sup> Lrp Site 5  
 GTAAATTCAATTCACCATGATGTTTTTATCTGAGTGTATTCTTGTGTTTGTGTTTTATT  
 Lrp Site 6 Lrp Site 1  
 CTAGTTTGATTTTGTGTTTGTAGGTTAAAA**GATC**GTTTAAATTAATATTTACAACATAAAA  
 Lrp site 2 **GATC**<sup>prox</sup> (-35) Lrp Site 3  
 AACTAAATTTAACTTATTGCGTGAAGAGTATTTCCGGGCCGGAAGCATATATTCAGGGGC  
 (-10)  
 CCGACAGAAGGGGGAAC**ATG**GCGCATCATGAAGTCATCAGTCAGTCAGGAAATGTGTTT  
 FooB →  
 TTGCTGAATATACGCGAGAGCGTACTGTTGCCCGGCTCTATGTCTGAAATGCATTTTTTT  
 TTAAGTATAGGTATTTCTTCTATTACAGTGCAGGGTCATTCTGGCTATGAAGGACTAT  
 CTGGTAGGCGGGCACTCCCGTAAGGAGGTCTGCGAGAAATACCAGATGAATAATGGGTAT  
 TTCAGTACAACGCTGGGGAGACTTATACGGCTGAATGCTCTTGCAGCAAGGCTTGCACCT  
 TATTATACAGATGAGTCGTCGGCATTGACTAAATTATGGCATTCCGGAGTTTCTGGAAG  
 \*\*\*  
 ATAAAAAAGAAGCCCTT**AGATCC**GACAACCGATGAAAGCGGCGACGCGCAGTTAATCCC  
 BglII / BamHI **LacZ** →  
 ACAGCCGCCAGTTCCGCTGGCGGCATTTAACTTTCTTTATCACACAGGAAACAGCT**ATG**  
 ACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGC  
 GTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA  
 GAGGCC

Figure 1



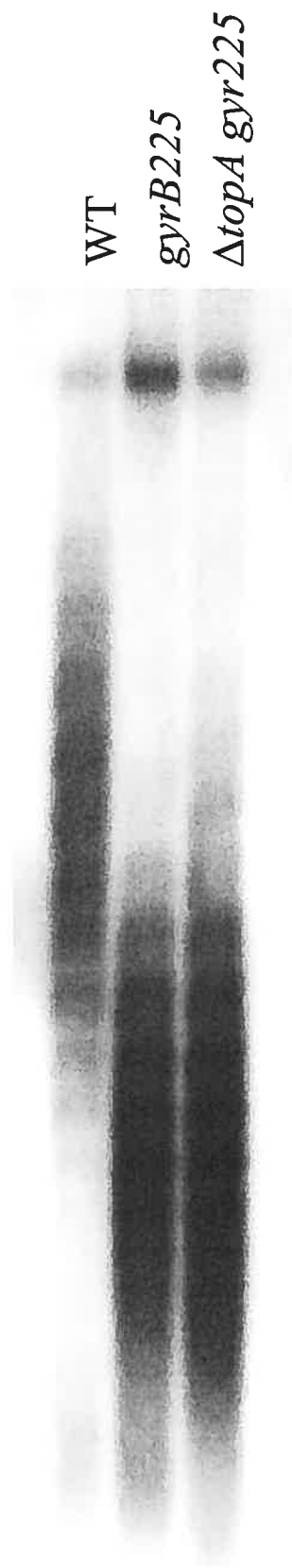


Figure 2

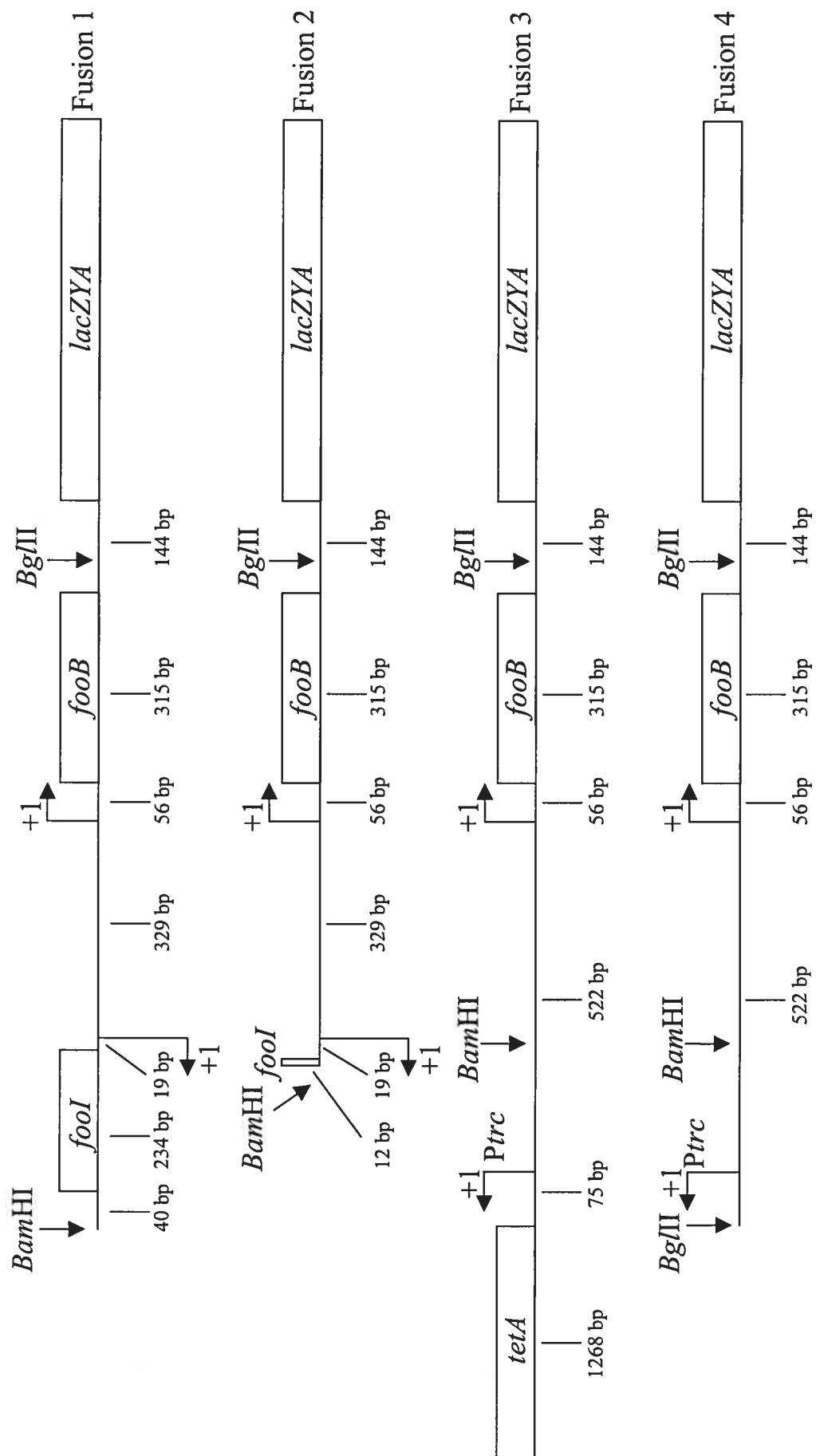


Figure 3

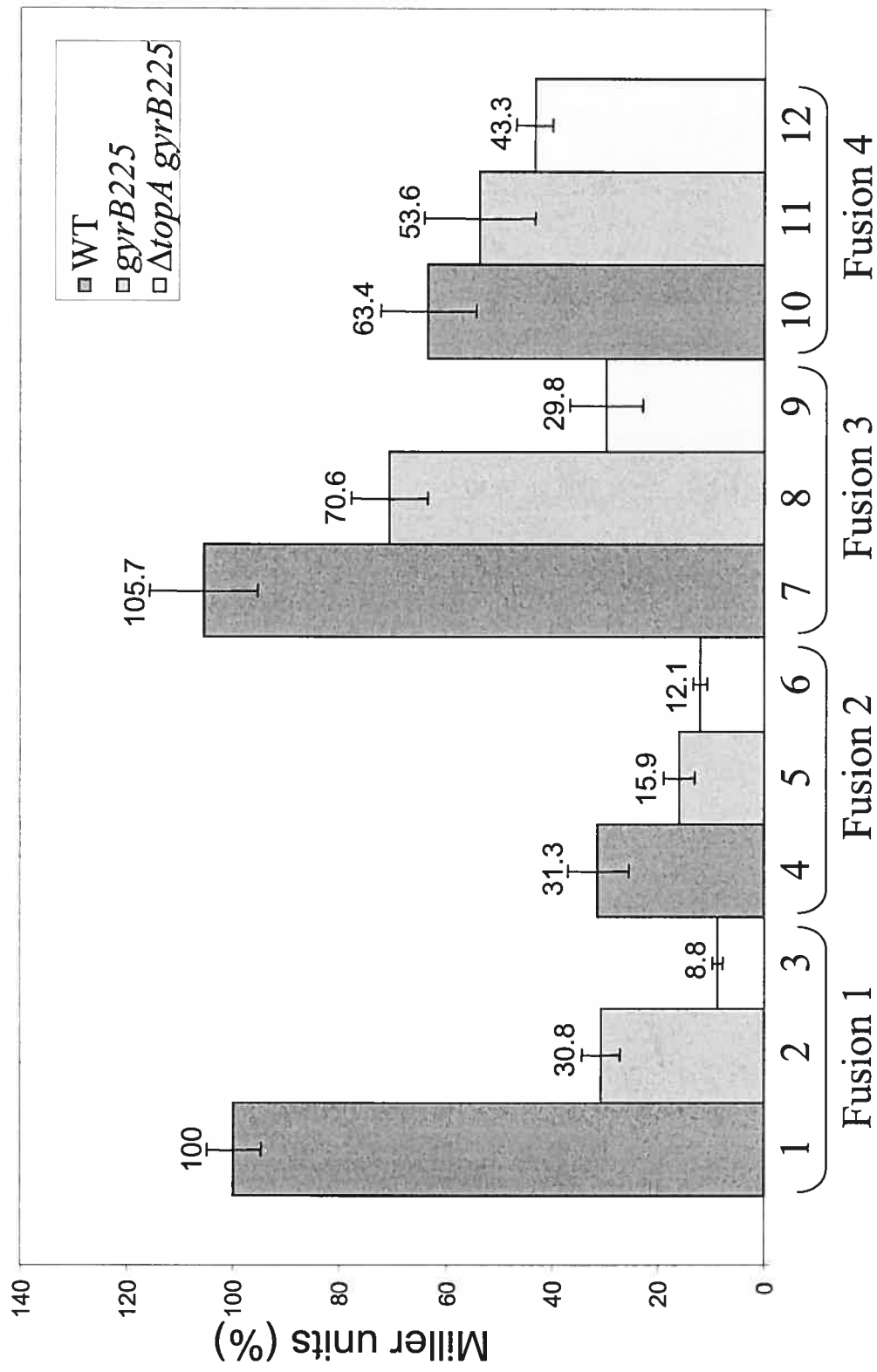


Figure 4

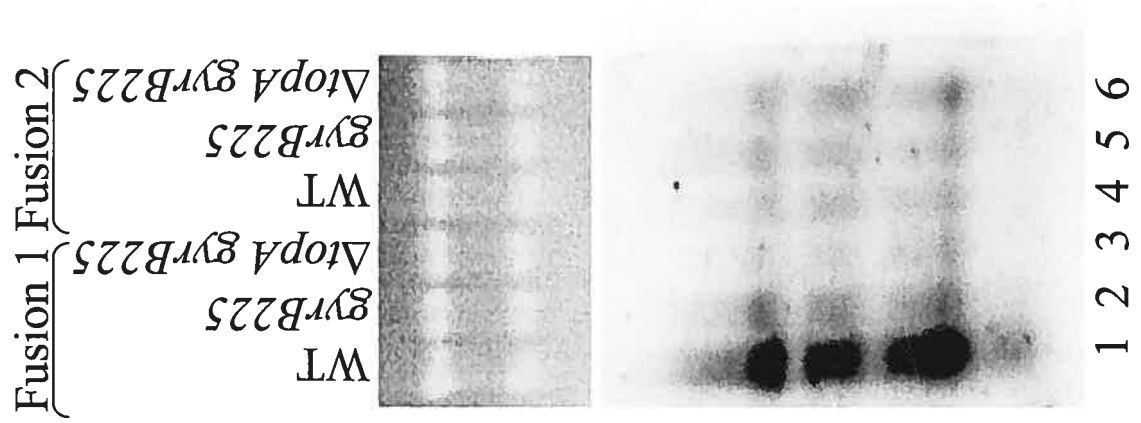


Figure 5

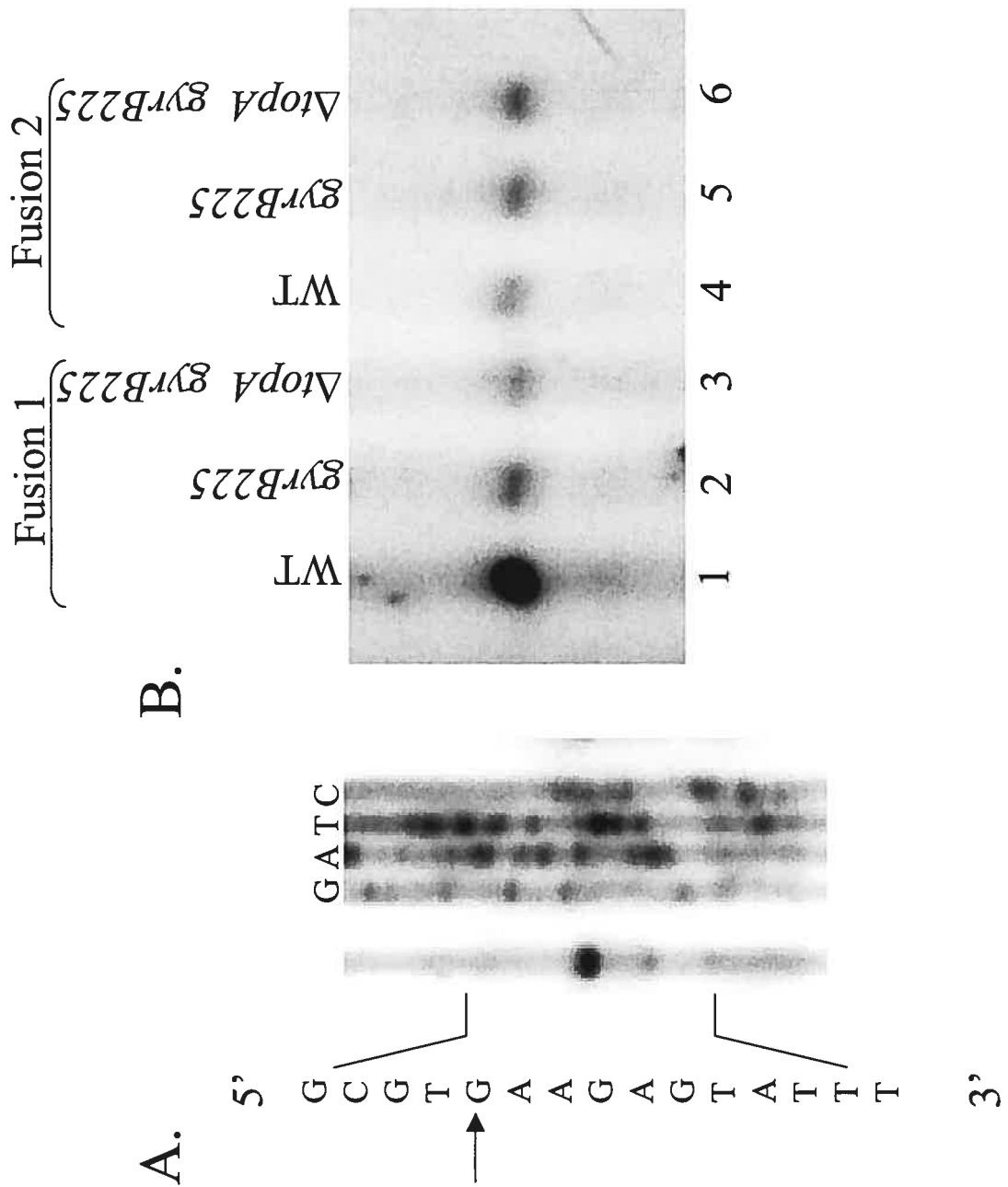


Figure 6

## SECTION III- Discussion

## Discussion

### 1. Effet du surenroulement d'ADN sur le promoteur *fooB*

Pour observer l'effet du surenroulement sur l'expression de *fooB*, des fusions transcriptionnelles du gène *fooB* avec le gène rapporteur *lacZ* dans des souches isogéniques ont été construites (Tessier *et al.*, figure 3). Les souches isogéniques utilisées sont dérivées de la souche DM800, un mutant  $\Delta topA$  *gyrB225* (DiNardo *et al.*, 1982). La mutation *gyrB225* est une mutation compensatoire affectant une sous-unité de la gyrase; cette mutation est liée à l'inactivation de *topA*, gène codant pour la topoisomérase I. La souche DM800 a possiblement acquis d'autres mutations compensatoires en réponse à l'absence de *topA* et toutes les souches isogéniques construites à partir de cette souche présenteront également les autres mutations compensatoires. Comme ces souches présentent le même génotype, une différence de l'expression de *fooB*, sera attribuable aux mutations spécifiques qui change les niveaux de surenroulement. En utilisant un plasmide rapporteur (pBR322) qui reflète l'état de la situation générale du surenroulement du chromosome, nous constatons que la mutation *gyrB225* présente dans les souches *gyrB225* et  $\Delta topA$  *gyrB225* diminue le surenroulement global d'environ 25% comparé à la souche sauvage. Il est important de noter que la délétion de *topA* n'altère pas davantage le surenroulement global du chromosome (Tessier *et al.*, figure 2).

Lorsque l'expression de *fooB* est évaluée à l'aide des fusions transcriptionnelles (Tessier *et al.*, figure 4), on voit l'expression maximale (2614 U) lorsque le niveau de surenroulement global de l'ADN est de type sauvage. Chez la souche mutante pour la sous-unité *gyrB* de la gyrase, l'expression du gène *fooB* est diminuée d'environ 60%. On en conclut que

la diminution de surenroulement global affecte l'expression de *fooB*. En plus du surenroulement global, le surenroulement local semble avoir un effet sur l'expression. En effet, chez la souche ayant subi une délétion du gène *topA*, l'expression de *fooB* est diminuée. Puisque les souches *gyrB225* et  $\Delta topA$  *gyrB225* ont des niveaux de surenroulement global d'ADN identiques, on peut déduire que la délétion du gène de la topo I amène des conséquences supplémentaires. Lorsque le gène *topA* est délété, il y a augmentation du surenroulement local dans cette région et cela affecte l'expression de *fooB*.

On pourrait se demander si ce changement d'expression du gène fimbriaire selon les niveaux de surenroulement est le résultat de changements post-transcriptionnels. Les différences d'expression ont été confirmées par des expériences utilisant l'ARN messenger. Les niveaux d'ARN messenger de *fooB* et *lacZ* ont été évalués avec des expériences de Northern blot (Tessier *et al.*, figure 5): ils reflètent les niveaux de  $\beta$ -galactosidase. De plus, à l'aide d'expériences d'extension d'amorces (Tessier *et al.*, figure 6), on peut constater que le gène *fooB* a bien un promoteur dont le taux d'initiation varie selon le degré de surenroulement de l'ADN et que la transcription est initiée au même site dans des souches différentes. Ces résultats confirment bien un effet de transcription et du surenroulement de l'ADN sur le gène *fooB*.

Au niveau moléculaire, lorsque les niveaux de surenroulement du chromosome sont de type sauvage (donc normaux), c'est la situation optimale pour permettre toutes les interactions moléculaires nécessaires à l'expression de *fooB*. Au niveau du promoteur, le surenroulement négatif favorise l'interaction de l'ARN polymérase avec le promoteur et facilite l'ouverture des brins pour la transcription, mais un changement de torsion peut influencer l'orientation des régions  $-35$  et  $-10$  et l'interaction de l'ARN polymérase. On savait déjà qu'une mutation *gyrB* diminue le surenroulement global et influençait les interactions moléculaires (Pruss et



Drlica, 1986). Ainsi une mutation de la gyrase diminue le niveau de surenroulement et ne facilite pas l'ouverture des brins par l'ARN polymérase au promoteur de *fooB*.

La topoisomérase I joue un rôle lors de la transcription en enlevant des supertours négatifs à l'arrière du complexe de transcription. Dans la souche  $\Delta topA$  *gyrB225*, il y a accumulation de supertours négatifs à l'arrière du complexe de transcription et le surenroulement local de la région intergénique *foo* devient trop négatif pour permettre l'initiation de *fooB* par l'ARN polymérase. Cette enzyme aurait un rôle-clé dans le maintien des niveaux de surenroulement optimaux pour permettre l'initiation de la transcription de *fooB*.

Le changement de torsion dans la région avoisinante du promoteur de *fooB* aurait pu déplacer le site d'initiation de celui-ci et pourrait être une hypothèse plausible qui expliquerait les différences d'expression du gène fimbriaire selon le surenroulement. Par contre, cette possibilité a été exclue en effectuant les expériences d'extension d'amorces qui indiquent un site d'initiation du gène *fooB* identique dans les trois souches isogéniques (Tessier *et al.*, figure 6).

Il existe des gènes dont l'initiation de la transcription est sensible au surenroulement : par exemple, *leu-500* (Chen *et al.*, 1992), *tyrT* (Muskhelishvili *et al.*, 1997) et *ilv* (Sheridan *et al.*, 2001; Opel *et al.*, 2001a et Opel et Hatfield, 2001b). Les gènes codant pour les topoisomérases sont aussi sensibles au niveau de surenroulement : le gène *topA*, est stimulé par l'augmentation du surenroulement (Tse-Dinh, 1998) et les gènes codant pour la gyrase sont stimulés par une diminution du surenroulement global du chromosome (Drlica, 1984). Par contre, le cas présent serait le premier où des effets de surenroulement global et local du chromosome influencent l'expression d'un gène.

Puisque la région intergénique de *fooB* des souches d'*Escherichia coli* 5131 et 4787 exprimant le fimbriae F165<sub>1</sub> partage 97% d'identité avec la région régulatrice de *pap*, du fimbriae P sérotype F13 de la souche J96 (Daigle *et al.*, 2000), on suppose que la régulation du fimbriae F165<sub>1</sub> est semblable à celle du fimbriae Pap. Dans la région intergénique de l'opéron *foo*, on trouve des séquences de liaisons homologues à Lrp (Nou *et al.*, 1995). Lrp est un régulateur global essentiel pour l'activation et la répression du fimbriae *pap*. Pour l'activation de la transcription de *pap*, on observe que Lrp se lie aux sites 4, 5, 6 et il y a méthylation par Dam du site GATC<sup>prox</sup>. Lors de l'inactivation de la transcription, Lrp se lie aux sites 1, 2, 3 et il y a méthylation par Dam aux sites GATC<sup>dist</sup>. La liaison de Lrp à l'ADN bloque la méthylation par Dam (Nou *et al.*, 1993) et entraîne une courbure de l'ADN (Wang et Calvo, 1993). De façon similaire, la liaison de ce régulateur influencerait la conformation de la région régulatrice de *foo*. Des expériences avec l'opéron *pap* démontre qu'il doit y avoir un espacement approprié entre les sites de liaisons de Lrp car l'insertion ou la délétion d'une seule base entre les sites 1 et 2 n'induit plus la variation de phase et fige la transcription dans la phase ON (Hernday *et al.*, 2002). Pour l'opéron *pap*, la liaison de Lrp aux sites 1, 2, 3 exerce un effet négatif sur la liaison de Lrp aux sites 4, 5, 6. L'exclusion mutuelle de Lrp est diminuée d'environ 5 fois lorsque l'ADN utilisé est non surenroulé (Hernday *et al.*, 2002). Une revue suggère qu'il existe une dépendance entre la transcription de *pap* et la topologie de l'ADN (Hernday *et al.*, 2002). Comme le modèle de régulation de l'opéron *foo* est basé sur celui de l'opéron *pap*, nous pouvons supposer que la liaison de Lrp a comme effet de maintenir la topologie appropriée de l'ADN intercistronique pour permettre la transcription de *fooB*.

La protéine CRP est nécessaire pour l'activation de la transcription du fimbriae Pap. Il est déjà connu depuis longtemps que l'expression de *papI* est régulée via CRP. Cette protéine a besoin d'AMPc pour se lier à ses

sites cibles. Les niveaux d'AMPc varie selon la concentration de carbone dans la cellule; si les niveaux de carbone sont bas, il y a plus d'AMPc et par la suite, l'activation de la transcription de *papI* a lieu via liaison de CRP (Blyn *et al.*, 1989 ; Goransson *et al.*, 1989). Malgré la distance (CRP se lie à 215 pb en amont du promoteur *papB*), la liaison de CRP serait aussi essentielle à l'activation du promoteur *papB* même en l'absence du promoteur divergent *papI*. Un fait intéressant à noter est que l'activation par CRP est dépendante de l'hélicité de la region intercistronique de *pap* (Weyand *et al.*, 2001). Pour le fimbriae F165<sub>1</sub>, la liaison de CRP pourrait aussi être dépendante de l'hélicité de l'ADN ; dans des mutants *gyr*, le surenroulement trop bas pourrait ne pas permettre la liaison de CRP et ainsi l'activation de *fooB* et *fooI*. De même dans un mutant *topA*, le surenroulement cette fois-ci serait trop élevé localement pour permettre la liaison (Annexe, figure 1).

Steck *et al.* en 1993 ont démontré que l'abondance de certaines protéines était modifiée lorsqu'il y avait atténuation dans le niveau global de surenroulement (Steck *et al.*, 1993). On pourrait donc s'interroger sur les niveaux des régulateurs qui interagissent avec l'opéron *foo*. Pourraient-ils être altérés par les niveaux de surenroulement? Nous avons déterminé à l'aide d'expériences de Northern Blot que les niveaux de Lrp et CRP ne sont pas affectés par le surenroulement (Annexe, figure2).

Dans la région intergénique de *fooIB*, on retrouve également des séquences de liaison homologues à PapB (Forsman *et al.*, 1989). Selon Xia *et al.*, qui ont étudié PapB, cette protéine agirait comme un dimère ou un tétramère *in vivo*. Ils soutiennent aussi que la liaison de PapB dépend de la conformation de l'ADN et qu'il interagit avec le sillon mineur de l'ADN car lors d'expériences, PapB compétitionne avec la drogue distamycine pour la liaison à l'ADN. La distamycine est une drogue qui affecte la courbure de l'ADN et se lie au sillon mineur. L'interaction de PapB, selon

les auteurs, pourrait stabiliser une conformation particulière de l'ADN (Xia *et al.*, 1998). Il pourrait donc y avoir encore un rôle de FooB dans le maintien d'un état de surenroulement particulier nécessaire à la transcription de l'opéron *foo*.

La régulation de l'initiation de la transcription par des protéines qui déplacent l'énergie de surenroulement est possible. La liaison d'une protéine peut maintenir une certaine région d'ADN dans une conformation particulière et peut entraîner un changement de surenroulement à un site adjacent. Il peut y avoir activation de l'initiation de la transcription d'un gène, si la changement de topologie survient dans une région promotrice et facilite l'ouverture des brins à l'ARN polymérase (Hatfield et Benham, 2002). Pour mieux comprendre les rôles des régulateurs et la topologie de l'ADN dans l'expression de l'opéron *foo*, il serait éventuellement intéressant d'effectuer des expériences de retards sur gel pour vérifier l'affinité et la force de liaison des régulateurs avec la région intergénique et des expériences (avec des plasmides-rapporteurs) qui permettraient de vérifier l'influence de la liaison d'un régulateur global avec une matrice d'ADN sur les niveaux de surenroulement. De plus, des expériences de «*footprinting*» pour confirmer les régions d'ADN liées semble être une étape logique pour vérifier si le modèle est semblable à celui de l'opéron *pap*. Cependant, les expériences qui semblent les plus intéressantes à effectuer sont les tests de transcription *in vitro*. En utilisant des matrices d'ADN avec différents niveaux de surenroulement, nous pourrions évaluer l'effet de régulateurs sur l'expression du *fimbriae*. Aussi, nous pourrions vérifier si les régulateurs tels que CRP, Lrp et Fool ont effectivement une influence dans le maintien d'une conformation particulière.

D'autre part, nous savons que le gène codant pour la topoisomérase I est impliqué dans la virulence de bactéries (Dozois *et al.*, 2002; Saïd-Salim *et al.*, 2003). Nous avons tenté de vérifier l'importance de ce gène dans la virulence des souches de *Escherichia coli* 5131. Pour ce faire, nous

avons tenté de construire des souches isogéniques mutantes pour le gène *topA* des souches virulentes sauvages 5131 et  $\chi$ 7122 (souche aviaire) en utilisant différentes méthodes : par transduction avec le bactériophage  $\lambda$ RS45 ou P1vir ou encore par recombinaison avec un plasmide lambda-Red (selon la méthode décrit dans Murphy et Campellone, 2003). Les souches suivantes ont été utilisées avec différents plasmides lambda-Red avec un insert *topA* : la souche *E. coli* 5131 avec pKM200 (résistance à la kanacymine), la souche *E. coli* MT008 avec pKM201 (résistance à l'ampicilline) et la souche aviaire  $\chi$ 7122 avec pTP223 (résistance à la tétracycline). Malheureusement, aucun mutant pour le gène *topA* a été obtenu dans les trois souches. Ceci semble nous indiquer que le gène est essentiel pour la survie de ces souches et qu'elles ne sont pas en mesure d'acquérir des mutations compensatoires nécessaires à leur survie.

## 2. Le rôle de Fool sur l'activité transcriptionnelle de *fooB*

Pour évaluer le rôle de Fool, nous avons mesuré l'activité du promoteur *fooB* par des dosages  $\beta$ -galactosidase avec des souches isogéniques possédant cette fois-ci seulement les 12 premiers nucléotides du gène *fool* (Tessier *et al.*, figure 3). Comme le promoteur du gène et les premiers nucléotides sont présents, l'ARN polymérase peut se lier et commencer la transcription. Il y aura donc un effet de transcription divergente sans le produit de cette transcription. Comparativement aux souches isogéniques comprenant le gène *fool* entier, nous remarquons immédiatement une diminution d'expression de *fooB* avec le surenroulement de type sauvage (Tessier *et al.*, figure 4). D'autre part, l'absence de Fool ne semble pas avoir un impact majeur sur l'expression de *fooB* dans les souches *gyrB225*, comparé toujours aux souches isogéniques ayant le gène *fool* entier. Ce résultat suggère que Fool ne

puisse pas se lier adéquatement lorsque les niveaux de surenroulement sont trop bas. Même dans la souche *ΔtopA*, l'absence de Fool stimule légèrement l'expression de *fooB*. Ce résultat nous suggère que le surenroulement doit être finement régulé pour permettre l'activité adéquate de Fool. Ces derniers résultats de dosages sont confirmés au niveau de l'ARN messager. D'ailleurs, nous constatons en effectuant des expériences d'extension d'amorces (Annexe, figure 3) que l'initiation à partir de ce gène est assez faible et que l'expression varie selon le surenroulement. Encore une fois, le site d'initiation dans les trois souches est identique. En considérant tous ces résultats, nous pouvons affirmer que Fool semble particulièrement sensible au niveau de surenroulement. Pour l'opéron *pap*, une récente étude nous indique que PapI augmente l'affinité de Lrp pour certaines séquences (ACGATC), ces dernières séquences contiennent le motif GATC qui est justement la cible de l'enzyme Dam. La liaison de PapI et Lrp est essentiel pour l'expression du fimbriae Pap (Hernday *et al.*, 2003). Même si la régulation de l'opéron *foo* n'est pas identique à *pap*, on peut supposer que Fool aurait également un effet sur l'affinité de Lrp pour des séquences particulières de l'ADN, mais cette dernière possibilité doit être confirmée par des expériences de « *gel shift* » et de « *footprinting* ».

### **3. La stimulation de l'activité de *fooB* par la transcription divergente en absence de *fool***

Pour mieux définir l'effet de la transcription divergente sur l'expression du gène *fooB*, d'autres constructions géniques ont été réalisées. Ainsi, le gène *fool* a été remplacé par un promoteur fort *trc* et le gène *tetA* dans les trois souches isogéniques au niveau du surenroulement (Tessier *et al.*, figure 3). Le promoteur *trc* est un promoteur fort largement utilisé dans les études de surenroulement et le gène *tetA* est le gène qui confère la

résistance à la tétracycline et code pour une protéine se liant à la membrane. Lorsque l'activité du promoteur est évaluée par dosages  $\beta$ -galactosidase chez les souches isogéniques (Tessier *et al.*, figure 4), on constate que la présence du promoteur fort divergent stimule la transcription à partir de *fooB* pour les trois souches comparé aux résultats des dosages pour les souches isogéniques n'ayant pas *fool* (fusion 2). Les niveaux d'expression de *fooB* pour la souche avec le surenroulement global de type sauvage sont rétablis par rapport aux niveaux des souches exprimant *Fool*, même que l'on remarque une petite stimulation. La transcription d'un promoteur divergent fort stimule même l'expression de *fooB* dans les souches *gyr*. On note une augmentation d'environ 40% d'expression pour la souche *gyrB225* et environ 20% pour la souche  $\Delta topA$  *gyrB225* comparé aux niveaux d'expression lorsque *Fool* est présent (Tessier *et al.*, figure 4). On note que le surenroulement semble avoir un effet capital pour l'expression du gène *fooB*. Les résultats nous indiquent que c'est la transcription de *fool* en elle-même qui semble plus importante que le produit du gène de *fool*.

De plus, lorsque le gène *fool* est seulement remplacé par le promoteur fort *trc*, on distingue une augmentation de l'expression dans la souche  $\Delta topA$  *gyrB225* par rapport aux données avec *tetA*. Par contre, l'absence de TetA ne stimule pas l'expression de *fooB* dans la souche avec le surenroulement sauvage et le mutant *gyrB225* (Tessier *et al.*, figure 4).

La particularité du gène *tetA* est intéressante car il provoque des niveaux de surenroulement négatifs élevés lorsqu'il est transcrit (Lynch et Wang, 1993). En effet, dans les cellules prokaryotes, il y a couplage entre la transcription et la traduction d'un gène. La protéine naissante TetA s'ancre à la membrane et empêche la diffusion des supertours générés par l'ARN polymérase qui transcrit ce même gène, ce qui amène un surenroulement négatif en excès. Selon le « *twin-domain model* », le

surenroulement généré par la transcription d'un promoteur divergent peut affecter un autre promoteur sensible au surenroulement qui est situé près (Liu et Wang, 1987). Ce surenroulement négatif en excès provoqué par la transcription de *tetA* est connu pour activer des gènes sur plasmide tels que *leu-500* dans des souches mutantes *topA* de *S typhimurium* (Chen et al., 1992). Sur un plasmide, le promoteur du gène *leu-500* de *S typhimurium* est actif seulement dans les souches *topA*, car le surenroulement dû à la transcription du gène adjacent *tetA* n'est pas résolu dû l'absence de *topA*. La protéine *tetA* naissante s'ancre à la membrane et cela mène plus de surenroulement négatif qu'une transcription normale. L'absence de la topo I et la transcription de *tetA* amène du surenroulement excessif qui induit la transcription de *leu-500*. Dans le cas du promoteur *leu-500*, le couplage transcription-traduction est nécessaire et le surenroulement local de l'ADN permet son activation (Tan et al., 1994). La transcription du gène *tetA* influence la transcription du gène *leu-500*. D'autant plus, le couplage entre les deux promoteurs *tet* et *leu-500* divergents a été démontré (Mojica et Higgins, 1996).

La transcription divergente influence positivement l'initiation de la transcription de *fooB*. Selon le « *twin domain model* », lorsqu'il y a présence de transcription divergente le surenroulement négatif s'additionne à l'arrière des complexes de transcription (Liu et Wang, 1987). Le niveau de surenroulement négatif dans la région d'un promoteur divergent est égale à la somme du surenroulement local généré par la transcription et le surenroulement global de la matrice, donc une diminution de la transcription des deux promoteurs devraient requérir une augmentation compensatoire du niveau du surenroulement global pour maintenir la transcription maximale des deux promoteurs (Opel et Hatfield, 2001b). Avec nos fusions, la transcription du gène *tetA* amènerait du surenroulement négatif additionnel près du promoteur *fooB* et activerait la transcription malgré l'absence de *Fool*. Dans les souches



*gyrB225*, un surenroulement global plus négatif amène une stimulation plus forte de la transcription du gène *fooB*. Dans la souche  $\Delta topA$  *gyrB225*, les supertours négatifs ne sont plus en mesure d'être résolus et en plus, il y a du surenroulement local plus négatif. Cette accumulation de supertours locaux facilite l'ouverture des brins du promoteur *fooB*. Ainsi, en plus du surenroulement global, le haut degré de surenroulement négatif local généré stimulerait fortement l'activité transcriptionnelle de *fooB*.

De plus, en utilisant les fusions contenant le promoteur fort *trc* seul, sans le gène *tetA*, nous remarquons encore un effet de stimulation du gène *fooB* par rapport aux souches avec et sans *fooI* (Tessier *et al.*, figure 4). L'effet du surenroulement que l'on observe est bel et bien dû à la transcription divergente et non pas seulement au phénomène d'ancrage à la membrane de TetA. Ces résultats démontrent qu'il est possible d'avoir une combinaison transcriptionnelle en absence d'ancrage à la membrane et l'importance du surenroulement négatif généré à l'arrière du promoteur divergent. Le surenroulement généré par le phénomène d'ancrage à la membrane de TetA est plus important que celui généré par le promoteur fort seul. Les résultats de dosages que l'on obtient pour la souche avec le surenroulement de type sauvage sont, tel qu'attendu, plus élevés en présence des fusions ayant le promoteur *trc* et *tetA*. La comparaison entre les souches possédant et ne possédant pas le promoteur fort semble indiquer que le surenroulement généré *in vitro* par la transcription est d'une importance proportionnelle à la force des promoteurs et la longueur des transcrits. Avec un promoteur fort, l'énergie potentiellement transmise au promoteur divergent *fooB* est plus élevée qu'avec l'énergie pouvant être transmise par la transcription de *fooI* (nous avons vu que le gène *fooI* est un gène faible). L'expression du gène *fooB* est bien régulée, non seulement le produit de *fooI* est-il important, mais aussi sa transcription en elle-même et le surenroulement généré.

Le phénomène de la transcription divergente est intéressant car il suggère un couplage transcriptionnel, c'est-à-dire que la transcription d'un promoteur influence la transcription d'un autre promoteur. Le surenroulement local généré à partir de la transcription divergente pourrait fournir l'énergie nécessaire pour permettre la transcription d'un autre promoteur. On peut également faire le parallèle avec l'opéron *ilvYC* (Opel et Hatfield, 2001b). Cet opéron contient deux gènes disposés de façon divergente, *ilvY* et *ilvC*. Pour permettre la transcription de *ilvC*, il doit y avoir un changement de surenroulement dans la région promotrice pour augmenter l'affinité de l'ARN polymérase; ceci se fait via la liaison d'un co-inducteur et de *ilvY*. L'expression de *ilvC* est augmentée par l'addition d'énergie locale de surenroulement et cette énergie est fournie par la transcription divergente de *ilvY* (Rhee *et al.*, 1999; Opel *et al.*, 2001a). Il y a un couplage transcriptionnel entre *ilvC* et *ilvY*; la transcription de *ilvC* n'a pas lieu sans la transcription de *ilvY*, ce n'est pas le produit de ce dernier gène qui est important mais bien sa transcription. Dans le cas de l'opéron *FoolB*, les résultats nous portent à croire qu'il y a bien un couplage transcriptionnel entre *fool* et *fooB*; la transcription de *fooB* étant facilitée lorsqu'il y a transcription divergente. Nous avons vu que ce n'est pas tant le produit du gène de *Fool* qui est important pour l'expression de cet opéron, mais sa transcription qui permet de relocaliser l'énergie de surenroulement au promoteur *fooB*.

#### **4. Effet du surenroulement de l'ADN sur les motifs de méthylation aux sites GATC de la région régulatrice *foo***

Des expériences de Southern ont été réalisées afin d'évaluer la méthylation de la région intergénique de *fooB* (Annexe, figure 4). Il est important de se remémorer que l'enzyme Dam (déoxyadénosine

méthylase) a pour cible deux séquences de la région intergénique *foo/B* : GATC<sup>dist</sup> et GATC<sup>prox</sup>. Pour l'opéron *pap*, la formation de patrons de méthylation spécifiques est essentielle pour permettre la variation de phase de l'opéron. Pour l'opéron *pap*, les patrons de méthylation sont les suivants : en phase ON, le site GATC le plus près (GATC<sup>prox</sup>) du promoteur *papB* est méthylé par Dam et le site GATC le plus distant (GATC<sup>dist</sup>) du promoteur *papB* (séparé par 102 pb de l'autre site GATC) est non méthylé; en phase OFF, le patron est inversé. Pour les expériences de Southern, nous avons utilisé des enzymes qui sont en mesure de discriminer les sites GATC selon la méthylation; l'enzyme *DpnI* coupe les sites GATC qui sont méthylés et *MboI* coupe les mêmes sites GATC mais seulement s'ils ne sont pas méthylés. Ces deux enzymes ont été employés sur la région intergénique *foo/B* des mêmes trois souches isogéniques utilisées dans les autres expériences (fusion1). On pourrait penser que la formation de patrons de méthylation spécifiques varie selon le degré de surenroulement de l'ADN ou encore qu'un site est favorisé par rapport à l'autre dans certaines souches.

En observant les résultats, nous pouvons tout d'abord affirmer qu'il n'y a pas de différence notable entre les niveaux de méthylation des trois souches (Annexe, figure 4). La différence d'expression de *fooB* dans les trois souches est bien dû à une différence du surenroulement et non, selon nos résultats, à un effet différentiel de méthylation de la région intergénique. Nous pouvons également observer qu'avec l'ADN provenant des trois souches digéré avec *MboI*, nous obtenons des bandes à haut poids moléculaires (environ 700, 800 et 1000 pb). Nous observons des bandes de plus petites tailles (environ 300, 400 et 500 pb) lorsque l'ADN des trois souches est digéré avec *DpnI*. Nous obtenons des bandes de bas poids moléculaires avec l'enzyme *DpnI* car elle coupe plus souvent la région intergénique en particulier les deux sites GATC; nous obtenons également des bandes de haut poids moléculaire avec *MboI* car cette enzyme ne coupe pas dans la région intergénique. Les sites GATC

sont méthylés dans les trois souches et il n'y a pas de différence selon le niveau de surenroulement de l'ADN.

## Conclusion

Les gènes fimbriaires sont d'une grande importance dans la virulence de souches pathogènes. Les niveaux de surenroulement de l'ADN, tant globaux que locaux influencent grandement l'expression de l'opéron *foo*, codant pour le fimbriae F165<sub>1</sub>. Le surenroulement doit être optimal pour qu'il y ait expression adéquate du fimbriae. En effet, lorsque le surenroulement est trop bas (*gyrB225*) ou encore trop élevé ( $\Delta topA$  *gyrB225*) les interactions protéines-ADN ne peuvent plus se faire correctement. Lorsque le surenroulement n'est pas optimal, il pourrait se produire un changement important de torsion de la double hélice. Ce changement de conformation aurait des répercussions sur l'interaction de Lrp ou encore CRP, régulateurs du système, empêchant l'expression du fimbriae. De plus, nous avons découvert que la transcription divergente à partir d'un promoteur fort peut complètement compenser pour l'absence de *Fool*. La transcription de *fooI* en elle-même est importante pour l'expression de *fooB*; le surenroulement généré par la transcription de ce gène divergent doit amener un niveau de surenroulement favorisant la transcription de *fooB*. La sensibilité de *fooB* au degré de surenroulement de l'ADN pourrait permettre une expression coordonnée des gènes de virulence en vue d'infecter et coloniser de façon efficace l'hôte.

## BIBLIOGRAPHIE

1. **Bhriain, N. N., and C. J. Dorman.** 1993. Isolation and characterization of a *topA* mutant of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **7**:351-8.
2. **Blomfield, I. C.** 2001. The regulation of *pap* and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* **45**:1-49.
3. **Blyn, L. B., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1990. Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential dam methylation states. *EMBO J* **9**:4045-4054.
4. **Blyn, L. B., B. A. Braaten, C. A. White-Ziegler, D. H. Rolfson, and D. A. Low.** 1989. Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *EMBO J* **8**:613-20.
5. **Braaten, B. A., X. Nou, L. S. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1994. Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**:577-88.
6. **Champoux, J. J.** 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**:369-413.
7. **Chen, D., R. Bowater, C. J. Dorman, and D. M. Lilley.** 1992. Activity of a plasmid-borne *leu-500* promoter depends on the transcription and translation of an adjacent gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8784-8.
8. **Chen, D., R. P. Bowater, and D. M. Lilley.** 1993. Activation of the *leu-500* promoter: a topological domain generated by divergent transcription in a plasmid. *Biochemistry* **32**:13162-70.
9. **Chen, S., and J. M. Calvo.** 2002. Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *J Mol Biol* **318**:1031-42.
10. **Cheng, B., C. X. Zhu, C. Ji, A. Ahumada, and Y. C. Tse-Dinh.** 2003. Direct interaction between *Escherichia coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **278**:30705-10.

11. **Cherifi, A., M. Contrepois, B. Picard, P. Goullet, J. de Rycke, J. Fairbrother, and J. Barnouin.** 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol Lett* **58**:279-83.
12. **Contrepois, M., J. M. Fairbrother, Y. K. Kaura, and J. P. Girardeau.** 1989. Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. *FEMS Microbiol Lett* **59**:319-23.
13. **Cook, D. N., D. Ma, N. G. Pon, and J. E. Hearst.** 1992. Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10603-7.
14. **Couturier, M., M. Bahassi el, and L. Van Melderen.** 1998. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends Microbiol* **6**:269-75.
15. **Daigle, F., C. M. Dozois, M. Jacques, and J. Harel.** 1997. Mutations in the *f165(1)A* and *f165(1)E* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microb Pathog* **22**:247-252.
16. **Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M. C. Tessier, H. Dezfulian, and J. Harel.** 2000. Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Res Microbiol* **151**:563-574.
17. **Deibler, R. W., S. Rahmati, and E. L. Zechiedrich.** 2001. Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*. *Genes Dev* **15**:748-61.
18. **DiNardo, S., K. A. Voelkel, R. Sternglanz, A. E. Reynolds, and A. Wright.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**:43-51.
19. **Donnenberg, M. S., and T. S. Whittam.** 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **107**:539-48.



20. **Dorman, C. J.** 1991. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect Immun* **59**:745-9.
21. **Dorman, C. J.** 1995. DNA topology and the global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. *Microbiology* **141** ( Pt 6):1271-80.
22. **Dorman, C. J., N. N. Bhriain, and C. F. Higgins.** 1990. DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *Nature* **344**:789-92.
23. **Dove, S. L., and C. J. Dorman.** 1994. The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit gene of *Escherichia coli* is sensitive to changes in DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **14**:975-988.
24. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:247-52.
25. **Drlica, K.** 1984. Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol Rev* **48**:273-289.
26. **Drlica, K.** 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**:425-433.
27. **Drolet, M., S. Broccoli, F. Rallu, C. Hraiky, C. Fortin, E. Masse, and I. Baaklini.** 2003. The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci* **8**:d210-21.
28. **Drolet, M., P. Phoenix, R. Menzel, E. Masse, L. F. Liu, and R. J. Crouch.** 1995. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli delta topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:3526-30.
29. **Drolet, M., H. Y. Wu, and L. F. Liu.** 1994. Roles of DNA topoisomerases in transcription. *Adv Pharmacol* **29A**:135-46.

30. **Fairbrother, J. M., R. Lallier, L. Leblanc, M. Jacques, and S. Lariviere.** 1988. Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. FEMS Microbiol Lett **53**:247-371.
31. **Fairbrother, J. M., S. Lariviere, and R. Lallier.** 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. Infect Immun **51**:10-5.
32. **Forsman, K., M. Goransson, and B. E. Uhlin.** 1989. Autoregulation and multiple DNA interactions by a transcriptional regulatory protein in *E. coli* pili biogenesis. EMBO J **8**:1271-7.
33. **Forterre, P., A. Bergerat, and P. Lopez-Garcia.** 1996. The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. FEMS Microbiol Rev **18**:237-48.
34. **Ganaba, R., M. Bigras-Poulin, J. M. Fairbrother, and D. Belanger.** 1995. Importance of *Escherichia coli* in young beef calves from northwestern Quebec. Can J Vet Res **59**:20-5.
35. **Goldstein, E., and K. Drlica.** 1984. Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. Proc Natl Acad Sci U S A **81**:4046-50.
36. **Goransson, M., P. Forsman, P. Nilsson, and B. E. Uhlin.** 1989. Upstream activating sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **3**:1557-65.
37. **Hacker, J.** 1992. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. Can J Microbiol **38**:720-7.
38. **Harel, J., F. Daigle, C. Forget, M. C. Tessier, C. Crost, and C. Martin.** 2000. Phase variation of F165(1) (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. Can J Microbiol **46**:1101-7.
39. **Harel, J., F. Daigle, S. Maiti, C. Desautels, A. Labigne, and J. M. Fairbrother.** 1991. Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*- related

- sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. FEMS Microbiol Lett **66**:177-82.
40. **Harel, J., J. Fairbrother, C. Forget, C. Desautels, and J. Moore.** 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. Vet Microbiol **38**:139-55.
  41. **Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992a. Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F165. J Gen Microbiol **138** ( Pt 11):2337-45.
  42. **Harel, J., C. Forget, J. Saint-Amand, F. Daigle, D. Dubreuil, M. Jacques, and J. Fairbrother.** 1992b. Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165(1), a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. J Gen Microbiol **138** ( Pt 7):1495-502.
  43. **Harel, J., M. Jacques, J. M. Fairbrother, M. Bosse, and C. Forget.** 1995. Cloning of determinants encoding F165(2) fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. Microbiology **141** ( Pt 1):221-8.
  44. **Hatfield, G. W., and C. J. Benham.** 2002. DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. Annu Rev Genet **36**:175-203.
  45. **Heddle, J. G., S. J. Blance, D. B. Zamble, F. Hollfelder, D. A. Miller, L. M. Wentzell, C. T. Walsh, and A. Maxwell.** 2001. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. J Mol Biol **307**:1223-34.
  46. **Heithoff, D. M., R. L. Sinsheimer, D. A. Low, and M. J. Mahan.** 1999. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. Science **284**:967-70.
  47. **Hernday, A., M. Krabbe, B. Braaten, and D. Low.** 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A **99** Suppl 4:16470-6.

48. **Hernday, A. D., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 2003. The mechanism by which DNA adenine methylase and PapI activate the *pap* epigenetic switch. *Mol Cell* **12**:947-57.
49. **Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, and E. Bremer.** 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-84.
50. **Hraiky, C., M. A. Raymond, and M. Drolet.** 2000. RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**:11257-63.
51. **Hsieh, L. S., R. M. Burger, and K. Drlica.** 1991. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]. Changes associated with a transition to anaerobic growth. *J Mol Biol* **219**:443-50.
52. **Hultgren, S. J., C. Hal Jones, and S. Normark.** 1996. Bacterial adhesins and their assembly, p. 2730-2756, *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. 2. ASM Press, Washington D.C.
53. **Johnson, J. R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**:80-128.
54. **Kaltenbach, L. S., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1995. Specific binding of PapI to Lrp-*pap* DNA complexes. *J Bacteriol* **177**:6449-55.
55. **Krabbe, M., N. Weyand, and D. A. Low.** 2000. Environmental control of pilus gene expression, p. 305-321, *Bacterial stress responses*, vol. 1. ASM press, Washington D.C.
56. **Krasilnikov, A. S., A. Podtelezhnikov, A. Vologodskii, and S. M. Mirkin.** 1999. Large-scale effects of transcriptional DNA supercoiling *in vivo*. *J Mol Biol* **292**:1149-60.
57. **Lee, V. T., and O. Schneewind.** 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev* **15**:1725-52.

58. **Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**:377-89.
59. **Lima, C. D., J. C. Wang, and A. Mondragon.** 1994. Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature* **367**:138-46.
60. **Liu, L. F., and J. C. Wang.** 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7024-7.
61. **Low, D. A., B. Braaten, and M. van der Woude.** 1996. Fimbriae, p. 146-157, *Escherichia coli* and *Salmonella*, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington D.C.
62. **Low, D. A., N. J. Weyand, and M. J. Mahan.** 2001. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun* **69**:7197-204.
63. **Luttinger, A.** 1995. The twisted 'life' of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. *Mol Microbiol* **15**:601-6.
64. **Lynch, A. S. and J.C. Wang.** 1993. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol* **175**(6):1645-55.
65. **Maiti, S. N., L. DesGroseillers, J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1994. Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165(1) of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. *Microb Pathog* **16**:15-25.
66. **Masse, E., and M. Drolet.** 1999a. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem* **274**:16659-64.
67. **Masse, E., and M. Drolet.** 1999b. Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **274**:16654-8.

68. **Masse, E., P. Phoenix, and M. Drolet.** 1997. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rnnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**:12816-23.
69. **Menzel, R., and M. Gellert.** 1994. The biochemistry and biology of DNA gyrase. *Adv Pharmacol* **29A**:39-69.
70. **Mojica, F. J., and C. F. Higgins.** 1996. Localized domains of DNAsupercoiling: topological coupling between promoters. *Mol Microbiol* **22**:919-28.
71. **Murphy, K. C. and K.G. Campellone.** 2003. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC Mol Biol* **4**:1-12.
72. **Muskhelishvili, G., M. Buckle, H. Heumann, R. Kahmann, and A. A. Travers.** 1997. FIS activates sequential steps during transcription initiation at a stable RNA promoter. *EMBO J* **16**:3655-65.
73. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
74. **Newman, E. B., R. T. Lin, and R. D'Ari.** 1996. The Leucine/Lrp regulon, p. 1513-1525, *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and molecular biology, vol. 1. ASM Press, Washington D.C.
75. **Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect Immun* **60**:5048-56.
76. **Ngeleka, M., M. Jacques, B. Martineau-Doize, F. Daigle, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 1993. Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165(1) fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infect Immun* **61**:836-43.
77. **Nou, X., B. Braaten, L. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1995. Differential binding of Lrp to two sets of pap DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **14**:5785-97.

78. **Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch, and D. Low.** 1993. Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. *Mol Microbiol* **7**:545-53.
79. **Opel, M. L., S. M. Arfin, and G. W. Hatfield.** 2001a. The effects of DNA supercoiling on the expression of operons of the *ilv* regulon of *Escherichia coli* suggest a physiological rationale for divergently transcribed operons. *Mol Microbiol* **39**:1109-15.
80. **Opel, M. L., and G. W. Hatfield.** 2001b. DNA supercoiling-dependent transcriptional coupling between the divergently transcribed promoters of the *ilvYC* operon of *Escherichia coli* is proportional to promoter strengths and transcript lengths. *Mol Microbiol* **39**:191-8.
81. **Orskov, I., and F. Orskov.** 1990. Serologic classification of fimbriae. *Curr Top Microbiol Immunol* **151**:71-90.
82. **Pettijohn, D.** 1996. The nucleoid, p. 156-166, *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington D.C.
83. **Phoenix, P., M. A. Raymond, E. Masse, and M. Drolet.** 1997. Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem* **272**:1473-9.
84. **Pruss, G. J., and K. Drlica.** 1986. Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:8952-6.
85. **Pruss, G. J., and K. Drlica.** 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**:521-3.
86. **Pruss, G. J., S. H. Manes, and K. Drlica.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**:35-42.
87. **Rahmouni, A. R., and R. D. Wells.** 1992. Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling *in vivo*. *J Mol Biol* **223**:131-44.

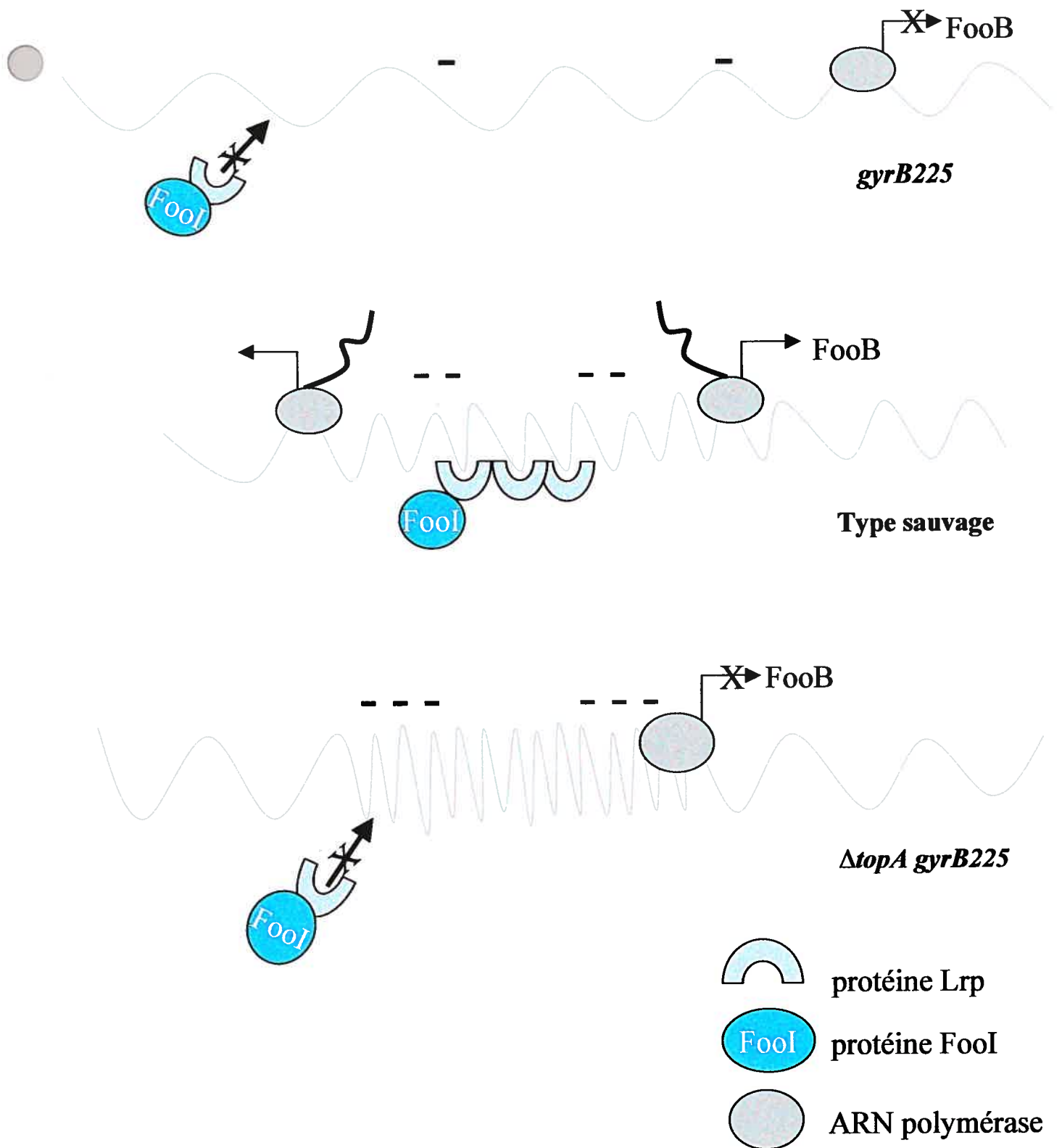
88. **Rhee, K. Y., M. Opel, E. Ito, S. Hung, S. M. Arfin, and G. W. Hatfield.** 1999. Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14294-9.
89. **Ross, W., J. Salomon, W. M. Holmes, and R. L. Gourse.** 1999. Activation of *Escherichia coli leuV* transcription by FIS. *J Bacteriol* **181**:3864-8.
90. **Rui, S., and Y. C. Tse-Dinh.** 2003. Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Front Biosci* **8**:d256-63.
91. **Said-Salim, B., P. M. Dunman, F. M. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, P. J. McNamara, S. Arvidson, T. J. Foster, S. J. Projan, and B. N. Kreiswirth.** 2003. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* **185**:610-9.
92. **Schneider, R., A. Travers, and G. Muskhelishvili.** 1997. FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **26**:519-30.
93. **Schneider, R., A. Travers, and G. Muskhelishvili.** 2000. The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol Microbiol* **38**:167-75.
94. **Sheridan, S. D., M. L. Opel, and G. W. Hatfield.** 2001. Activation and repression of transcription initiation by a distant DNA structural transition. *Mol Microbiol* **40**:684-90.
95. **Sinden, R. R.** 1994. DNA structure and function. Academic Press, Inc., San Diego, California.
96. **Snyder, L., and W. Champness.** 1997. Molecular genetics of bacteria, vol. 1. ASM Press, Washington D.C.
97. **Steck, T. R., R. J. Franco, J. Y. Wang, and K. Drlica.** 1993. Topoisomerase mutations affect the relative abundance of many *Escherichia coli* proteins. *Mol Microbiol* **10**:473-81.



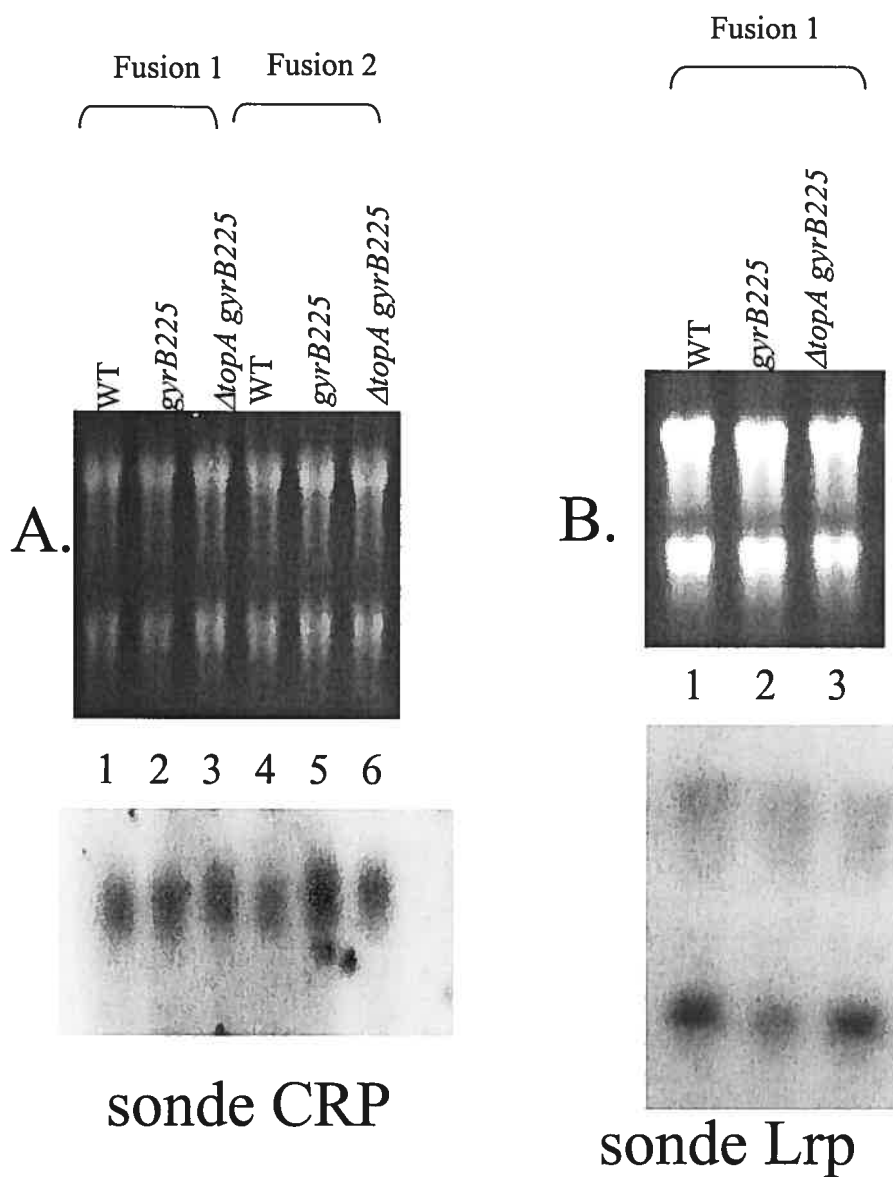
98. **Tan, J., L. Shu, and H. Y. Wu.** 1994. Activation of the *leu-500* promoter by adjacent transcription. *J Bacteriol* **176**:1077-86.
99. **Travers, A., R. Schneider, and G. Muskhelishvili.** 2001. DNA supercoiling and transcription in *Escherichia coli*: The FIS connection. *Biochimie* **83**:213-7.
100. **Tse-Dinh, Y. C.** 1998. Bacterial and archeal type I topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* **1400**:19-27.
101. **van der Woude, M., W. B. Hale, and D. A. Low.** 1998. Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in *gut* and *pap* operons. *J Bacteriol* **180**:5913-20.
102. **von Freiesleben, U., and K. V. Rasmussen.** 1992. The level of supercoiling affects the regulation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **143**:655-63.
103. **Wang, J. C.** 1971. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol* **55**:523-33.
104. **Wang, J. C.** 1996. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **65**:635-92.
105. **Wang, J. C.** 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:430-440.
106. **Wang, Q., and J. M. Calvo.** 1993. Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher-order nucleoprotein structure. *EMBO J* **12**:2495-501.
107. **Weyand, N. J., B. A. Braaten, M. van der Woude, J. Tucker, and D. A. Low.** 2001. The essential role of the promoter-proximal subunit of CAP in *pap* phase variation: Lrp- and helical phase-dependent activation of *papBA* transcription by CAP from -215. *Mol Microbiol* **39**:1504-22.
108. **White-Ziegler, C. A., M. L. Angus Hill, B. A. Braaten, M. W. van der Woude, and D. A. Low.** 1998. Thermoregulation of *Escherichia coli* *pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol Microbiol* **28**:1121-37.

109. **Xia, Y., K. Forsman, J. Jass, and B. E. Uhlin.** 1998. Oligomeric interaction of the PapB transcriptional regulator with the upstream activating region of pili adhesin gene promoters in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **30**:513-23.
110. **Xia, Y., D. Gally, K. Forsman-Semb, and B. E. Uhlin.** 2000. Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO J* **19**:1450-1457.
111. **Xia, Y., and B. E. Uhlin.** 1999. Mutational analysis of the PapB transcriptional regulator in *Escherichia coli*. Regions important for DNA binding and oligomerization. *J Biol Chem* **274**:19723-30.

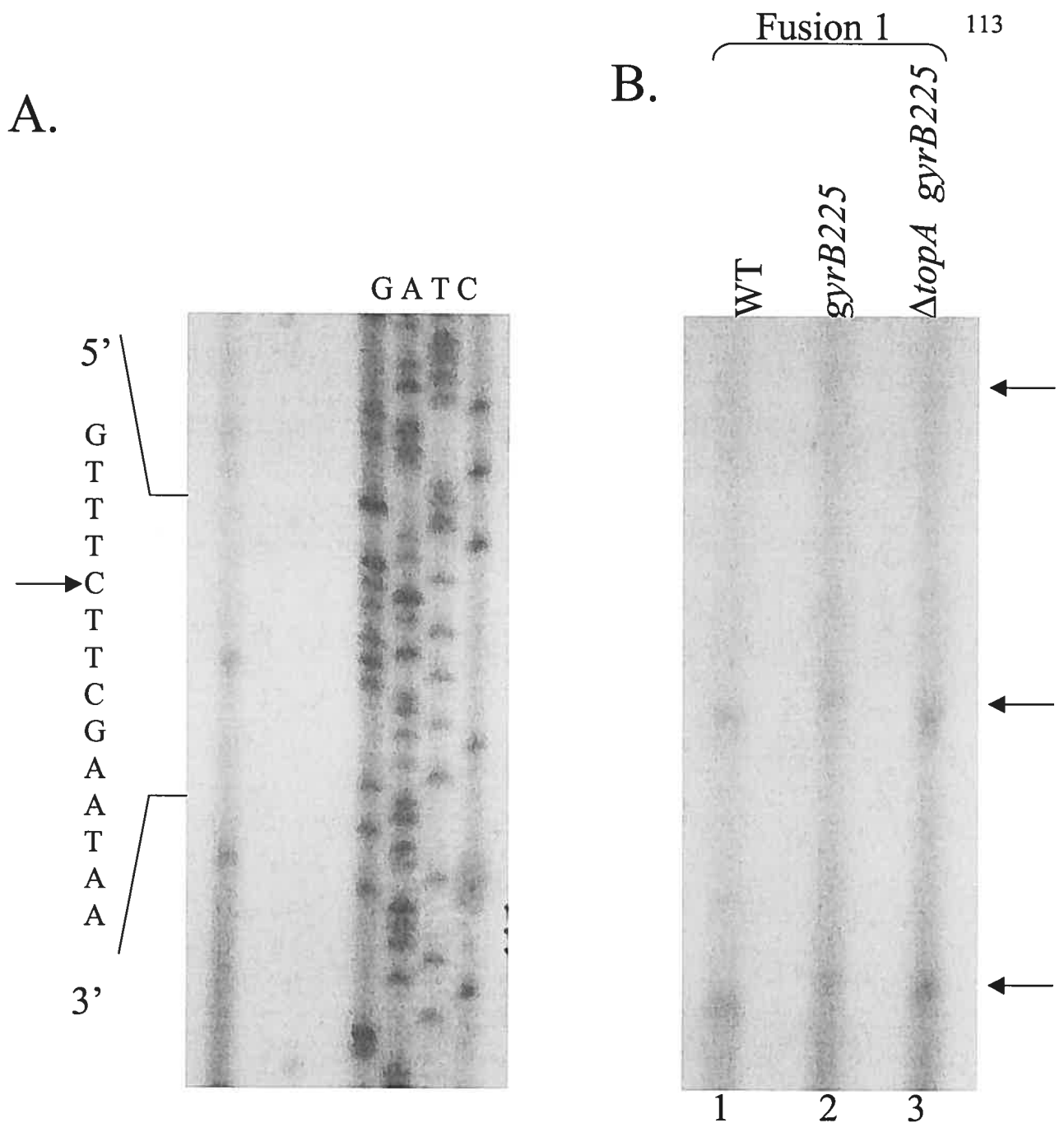
ANNEXE



**Figure 1. Dessin schématique illustrant le modèle proposé pour l'effet du surenroulement de la région intergénique sur l'expression de *fooB*.** Le niveau de surenroulement, autant global que local, doit être finement ajusté pour permettre la transcription de *fooB*. (- : surenroulement négatif).



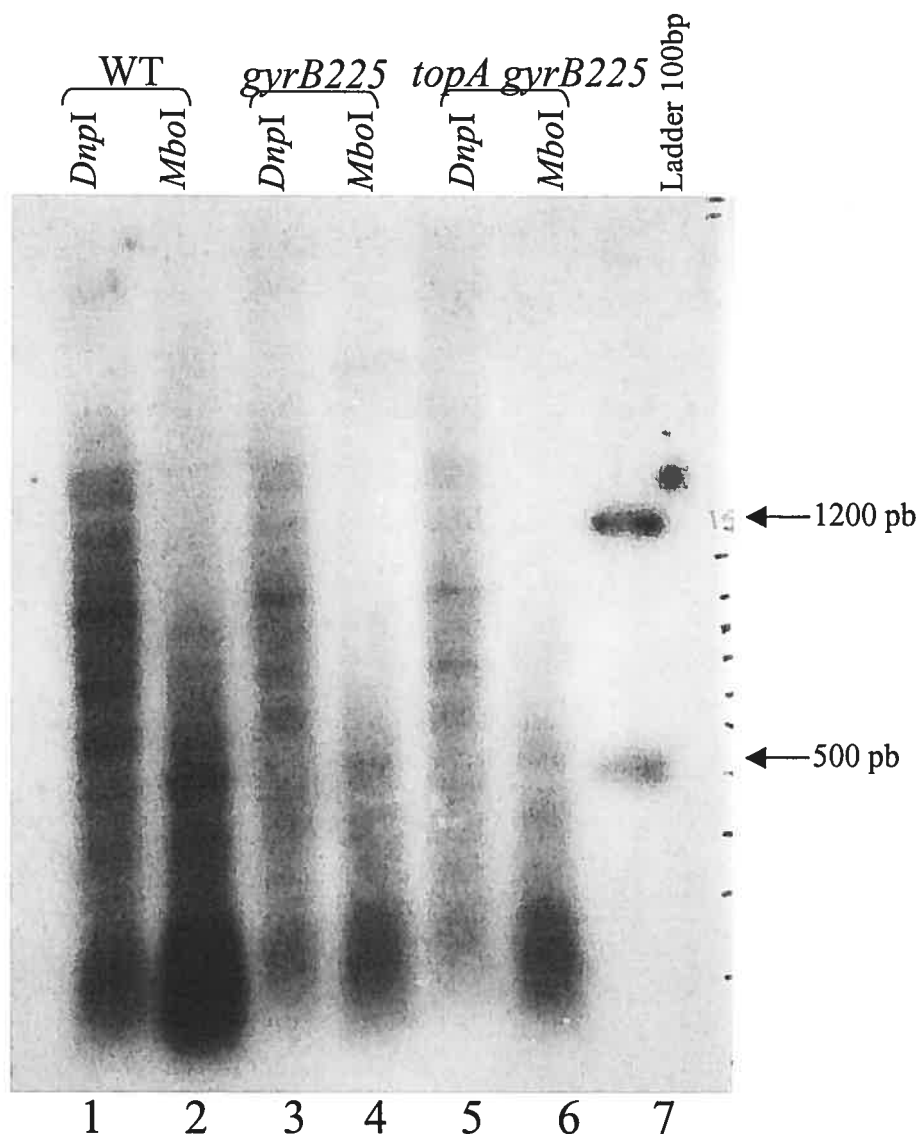
**Figure 2. Analyse des régulateurs globaux CRP et Lrp selon le surenroulement.** A. Northern blot avec une sonde *crp* et *lrp* pour démontrer que les différences des niveaux d'expression de *fooB* dans les souches ne sont pas dû à des changements d'expression de *crp* ou *lrp*. Les Northern blot ont été réalisés avec des sondes Lrp d(CGCACACGCTCAAGGCACGGCGTTGGGGAAAGTCCCACACGTTTAGAAAGCTCGACG) ou Crp d(GGCAATGAGACAACCATTCGAGAGTCGGGTCTGTTTGCGGTTTGCCAAGCACC) tel que décrits dans Tessier et al..



**Figure 3. L'effet du surenroulement sur l'expression de *fool*.**

**Analyse d'une extension d'amorce.**

- A. Région du site de départ de la transcription de *fool* déterminé par extension d'amorce. La flèche indique le site identifié +1.
- B. L'extension d'amorce a été réalisée avec une sonde 5'CGCCTCTGCAATTTCTGC 3' et 30  $\mu$ g d'ARN comme décrit précédemment par Hraiky *et al.* (Hraiky, 2000). Nous pouvons observer trois bandes, la bande du haut correspond au "full length" (249 pb) et les deux autres bandes correspondent à des tailles plus petites dû à l'arrêt prématurée de la transcription par l'ARN polymérase.



**Figure 4. Étude de la méthylation des sites GATC de la région intergénique *folB*.**

Les cellules ont poussé dans les mêmes conditions que pour les expériences de dosage  $\beta$ -galactosidase puis l'ADN était extrait. 10  $\mu$ g de l'ADN génomique a été digéré overnight à 37°C avec *Pst*I et *Bam*HI. Après purification au phénol-chloroforme l'ADN a été digéré 6 heures à 37°C avec *Dpn*I ou *Mbo*I. Après purification au phénol-chloroforme l'ADN a été mis sur gel d'agarose 1,5% et transféré sur membrane HybondN (Amersham RPN303N). Un PCR a été réalisé avec les oligos suivants: 5'GAATTTGCTTTTGTGGCTTT3' et 5'AGACATAGAGCCGGGCAAC3' afin de préparer une sonde pour hybrider la membrane. L'hybridation de la sonde du Southern a été réalisée avec 5  $\mu$ L de  $\alpha$ dCTP (AA0005 d'Amersham) et le kit Random primed DNA labeling kit ready-to-go (no1004760 de Roche) selon le protocole décrit dans Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.